

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



HELENA ROSA CAMPOS RABANG

ANÁLISE RADIOGRÁFICA E MICROBIOLÓGICA
DE CANAIS RADICULARES DE DENTES DE CÃES COM LESÃO PERIAPICAL
ANTES E APÓS PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba, da Universidade Estadual de
Campinas, como parte dos requisitos para
obtenção de grau de Doutor em Clínica
Odontológica – Área de Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho

PIRACICABA

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

Rabang, Helena Rosa Campos.
R112a Análise radiográfica e microbiológica de canais radiculares de dentes de cães com lesão periapical antes e após preparo químico-mecânico. / Helena Rosa Campos Rabang. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Francisco José de Souza Filho.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Radiografia. 2. Microorganismos. 3. Endodontia. 4.
Inflamação. I. Souza Filho, Francisco José de. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba.
III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Radiographic and microbiological analysis of root canals of dogs' teeth with periapical lesions before and after chemo-mechanical preparation

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Radiography. 2. Microorganisms. 3. Endodontics. 4. Inflammation

Área de Concentração: Endodontia

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Francisco José de Souza Filho, Marcos César Pimenta de Araújo, Pedro Felício Estrada Bernabé, Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Eduardo Dias de Andrade

Data da Defesa: 16-02-2009

Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 16 de Fevereiro de 2009, considerou a candidata HELENA ROSA CAMPOS RABANG aprovada.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Francisco Jose de Souza Filho".

PROF. DR. FRANCISCO JOSE DE SOUZA FILHO

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Marcos Cesar Pimenta de Araujo".

PROF. DR. MARCOS CESAR PIMENTA DE ARAUJO

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Pedro Felicio Estrada Bernabé".

PROF. DR. PEDRO FELICIO ESTRADA BERNABÉ

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes".

PROFa. DRa. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Eduardo Dias de Andrade".

PROF. DR. EDUARDO DIAS DE ANDRADE

*Senhor,
tu chegas ao mais profundo
de mim e me conheces por dentro.
Sabes quando me detenho ou quando não sei o que fazer;
entendes minhas ilusões e meus desejos como se fossem teus;
em meu caminho puseste uma trilha,
em meu descanso te sentaste a meu lado;
tocaste todos os meus projetos palmo a palmo.*

Salmo 139

*Não temas, porque eu sou contigo;
não te assombres, porque eu sou o teu Deus;
Eu te fortaleço, e te ajudo,
e te sustento com minha destra fiel.*

Isaías 41.10

*A Ti, Senhor,
agradeço por Tudo, e dedico, em louvor, este trabalho.*

*A família continua a ser a fonte primeira e principal
de nossa personalidade e de nossa educação,
o lugar onde recebemos esse “pão de carinho”
que nos vai fazendo crescer e viver.*

Manuel Madueño

*Aos meus amados pais, Gilberto e Irene,
que por amor me tiveram,
sustentando-me infinitamente desde minha concepção e sempre.
Dedico...*

Dorme, filha minha.

*Olha: entre os ramos adormeceu o vento... Dorme.
Se ao despertar não me encontrares, eu te falarei ao longe;
uma aurora sem sol virá a deixar-te
meu invisível beijo;
dorme; me chamam, concília o sono.*

Juan Zorrilla de San Martín

*À minha querida filha Stephanie,
who will always be my little BABY,
for giving me the strength when I needed it and overcoming my physical absence.
You are my blessed sunshine!*

*We have weathered many storms of life
And shed a lot of tears
We have also shared the laughter
Throughout our married years*

*God must have thought me special
To give me a companion such as you
To share life's precious moments
Each day – a life through...*

J. Morse, 1955

*To my beloved husband Peter,
to whom I gave my vow of a sharing life,
for the many storms we have weathered,
may the Lord keep our blessed marriage, which was meant to be.*

*Ser Mestre é um ato de fé.
Fé na possibilidade de mudar o mundo educando,
fé no indivíduo, fé na supremacia da riqueza intelectual.
Ser mestre é um ato de amor.
Porque a entrega de si está implícita na tarefa,
porque se dá com as mãos cheias sem esperar retribuição.
Ser mestre é ser um sonhador.
Crer, mais além desta época frívola e céptica,
no espírito do homem.
E crer que algum dia, ao final do caminho,
podemos transferir esta tocha a um discípulo, outro sonhador.*

Lídia Maria Riba

*Ao meu estimado orientador,
Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho,
por ter incentivado a concretização de meu antigo sonho de ser mestre,
por ter incentivado a continuidade de minha formação com o doutorado,
pela honra e oportunidade ímpar de ser sua discípula e admiradora.*

*A vida oferece oportunidades
em momentos que não se repetem...
Hoje não quero perder esta possibilidade
de agradecer...*

Kristiane e Volker Wybranietz

Especialmente...

*À Prof^a Dr^a Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes,
admirada por sua completa dedicação a pesquisa e ao ensino.*

*Ao Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia,
admirado por seu constante dinamismo na pesquisa e no ensino.*

*A todos os diletos professores que participaram e incentivaram minha formação,
em especial, e como símbolo maior de amizade,
ao meu querido e saudoso Prof. George Antonio Fonseca.*

*Meu amigo é um porto onde passo as tempestades.
Um oásis verde em meio aos meus desertos.
Meu amigo é um vale repleto de flores
onde busco a cor e o aroma da vida.
Meu amigo é às vezes um silêncio insondável
que devo aprender a respeitar.
Meu amigo é um cume de onde posso olhar sem cair.
Meu amigo é o poço almofadado onde caio sem me ferir.*

Tato Ortega

Agradeço...

*A todos os meus Amigos, do passado e do presente,
principalmente aqueles que tornaram este momento ainda mais enriquecido e possível.*

*De todos os animais que conhecemos,
o Cão é o que mais se uniu a nós.
Sejam príncipes que lhe dão farta comida e leito de plumas,
ou mendigos que dormem ao relento
só podem oferecer-lhe uma pequena parte de suas migalhas:
idêntica é a sua afeição e dedicação,
e com igual amor lambe a mão ornada de jóias
e os dedos trêmulos, consumidos de doença e de fome.*

Theo Gygas

Agradeço...

Ao Cão de Raça Indefinida,, que proporcionou a realização desta pesquisa.

Agradeço...

*À Encantadora **Cidade de Piracicaba**, que com seu Povo hospitaleiro, seu histórico Rio
e belíssimo pôr do sol, me conquistou para sempre.*



Agradeço...

À FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. FRANCISCO HAYTER NETO, pelo profissionalismo e espírito científico em que nos espelhamos na continuidade de nossa formação.

À COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO DA FOP-UNICAMP, na pessoa do Prof. Dr. JACKS JORGE JUNIOR, pela empenho seriedade e dedicação com que conduz o seu trabalho.

À COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO DE CLÍNICA ODONTOLÓGICA da FOP-UNICAMP, na pessoa da Prof^a. Dr^a. RENATA CUNHA MATEUS RODRIGUES GARCIA, pela seriedade em suas atividades.

Ao Chefe do DEPARTAMENTO DE DENTÍSTICA RESTAURADORA, da FOP-UNICAMP Prof. Dr. MARCELO GIANINNI, pelo apoio que nos proporcionou na condução da pesquisa.

Ao Professor Titular da DISCIPLINA DE ENDODONTIA da FOP/UNICAMP, Prof. Dr. FRANCISCO JOSÉ DE SOUZA FILHO, meu estimado orientador, pelo dinamismo e inteligência com que nos inspira a viver a Endodontia.

Ao Professor Responsável pela DISCIPLINA DE ENDODONTIA da FOP-UNICAMP, Prof. Dr. ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA, pela confiança que nos tem depositado, suporte inestimável no ensino e amizade compartilhada com nossas famílias.

Aos Professores da área da DISCIPLINA DE ENDODONTIA da FOP-UNICAMP, Prof^a. Dr^a BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES, Prof. Dr. CAIO RANDI FERRAZ e Prof. Dr. JOSÉ FLÁVIO AFFONSO DE ALMEIDA, pelo apoio, incentivo, e espírito de amizade com que nos conduziram ao longo do curso.

Ao Prof. Dr. LUIS VALDRIGHI, pelos ensinamentos e receptividade quando de nosso ingresso à pós-graduação nesta renomada instituição de ensino.

Aos Membros da BANCA DE QUALIFICAÇÃO desta tese: Prof. Dr. ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA, Prof^a. Dr^a. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES, e Prof. Dr. ROGÉRIO CASTILHO JACINTO, pela avaliação detalhada e profunda contribuição no enriquecimento deste trabalho.

Aos Membros da BANCA DE DEFESA desta tese: Prof. Dr. FRANCISCO JOSÉ DE SOUZA FILHO, Prof. Dr. MARCOS CESAR PIMENTA DE ARAÚJO, Prof. Dr. PEDRO FELÍCIO ESTRADA BERNABÉ, Prof^a. Dr^a. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES e Prof. Dr. EDUARDO DIAS DE ANDRADE, pela deferência de suas participações, honrando-nos com seus questionamentos em irrefutável contribuição ao presente trabalho.

Aos meus queridos, inesquecíveis e fiéis amigos, respeitados profissionais de ensino, Prof. Dr. CÍCERO ROMÃO GADÉ NETO, Prof^a. Dr^a. ERICKA TAVARES PINHEIRO e Prof^a. Dr^a. FLAVIANA BOMBARDA DE ANDRADE FERREIRA e ROGÉRIO DE CASTILHO JACINTO, por tudo, saudades de nosso convívio.

Aos meus estimados colegas e amigos do Curso de Doutorado: Prof Dr. DANIEL PINTO DE OLIVEIRA, Prof Dr. DOUGLAS GIORDANI CORTEZ, Prof Dr. FÁBIO ROBERTO DAMETTO, Profª. Drª. IADASA DE QUADROS, Profª. Drª. MORGANA ELI VIANNA, Prof Dr. ROGÉRIO DE CASTILHO JACINTO e Profª. Drª. TETIS SEREJO SAUÁIA, pelo alegre convívio, pela força e carinho constantes, e ainda pela oportunidade de crescer pessoal e profissionalmente.

Aos meus prezados colegas e amigos, alunos e ex-alunos do Curso de Mestrado e Doutorado em Clínica Odontológica; em especial a ADRIANA SOARES, ANA CAROLINA LIMA, DANNA MOTTA, FERNANDA SIGNORETTI, GISELE ABI-RACHED, JULIANA NASCIMENTO, LUCIANO CINTRA, MARAISA DELBONI, NEYLLA SENNA, THAIS ARCOSSI e VANESSA BERBER, pela constante demonstração de companheirismo, colaboração e oportunidade de enriquecimento técnico, científico, pessoal e espiritual.

Ao meu estimado ex-aluno e amigo Prof. FREDERICO CANATO MARTINHO, pela perseverança que me tem sido de exemplo, pela constante demonstração de amizade e por todo o carinho e apreço que me tem demonstrado ao longo do tempo (Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas"- Saint Exupéry).

Ao meu querido colega e amigo Prof. FRANCISCO MONTAGNER, pelo exemplo de retidão que tanto admiro, pela ajuda constante e desprendida, pela amizade e inestimável apoio a este trabalho.

Aos funcionários da FOP/UNICAMP, em especial a ANDERSON LAERTE TEIXEIRA, na Prefeitura do Campus; ÉRICA ALESSANDRA PINHO SIGNHORETI e RAQUEL QUINTANA MARCONDES CESAR SAQUI, na Coordenação da Pós-Graduação; EMÍLIO CARLOS SALLES, na Acessoria da Pós-Graduação; WANDERLEI LIMA DE ALMEIDA, no Biotério; MARILENE GIRELLO, APARECIDA CASSIERI DA CRUZ e ELISEO APARECIDO BERTTI, na Biblioteca; ADAILTON DOS SANTOS LIMA, ANA CRISTINA DO AMARAL GODOY, RUBENS MARQUES PAYÃO e WANDERLY LIMA DE ALMEIDA, na Endodontia; e a estagiária GEOVANIA CALDAS DE ALMEIDA, na Endodontia; pela atenção, pelo carinho e auxílio sempre presentes.

À FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "Julio de Mesquita Filho", na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. PEDRO FELÍCIO ESTRADA BERNABÉ, pelo espírito científico e fraterno com que nos apoiou na continuação desta pesquisa.

Aos estimados professores da DISCIPLINA de ENDODONTIA da FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "Julio de Mesquita Filho", em especialmente ao Prof. Dr. ROBERTO HOLLAND e ao Prof. Dr. JOÃO EDUARDO GOMES FILHO, que tão fraternamente nos receberam na continuação desta pesquisa.

Às funcionárias do LABORATÓRIO de ENDODONTIA da FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "Julio de Mesquita Filho", NELCI, HERMELINDA e NEUZA, pelo carinho e empenho com que nos receberam.

À minha inesquecível FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO (FO-UFRJ), onde vivi meus anos de acadêmica e de aluna de Especialização, plenos de lutas e risos, esperanças e sonhos; saudade indelével, recordações e reconhecimento eternos.

Agradeço...

Aos Exmº Sr. VA (Md) EDSON BALTAR DA SILVA, Diretor de SAÚDE DA MARINHA, pela amizade, pelo imprescindível incentivo à Odontologia Naval e apoio para que pudéssemos concluir este curso.

Ao Exmo Sr. VA (Md-RM1) JOSÉ CARLOS MONTEIRO DE MELO, Ex-Diretor de SAÚDE DA MARINHA, pela amizade e pelo inesquecível incentivo e apoio que nos tornou possível o ingresso no Programa de Pós-Graduação.

Ao Exmº Sr. VA (Md-RM1) HELTON JOSÉ BASTOS SETTA, Ex-Diretor de SAÚDE DA MARINHA, por acreditar em nosso potencial e apoiar a continuidade de nossa formação acadêmica.

Ao Exmº Sr. CA (Md) PAULO CESAR DE ALMEIDA RODRIGUES, Diretor do CENTRO MÉDICO ASSISTENCIAL DA MARINHA, pela dedicação e pela deferência com que sempre nos recebeu.

Ao Exmº Sr. CA (Md-RM1) CARLOS EDSON MARTINS DA SILVA, Ex-Diretor do CENTRO MÉDICO ASSISTENCIAL DA MARINHA, pela amizade, confiança pessoal e profissional que sempre nos dispensou.

Ao Exmº Sr. CA (Md) CELSO BARBOSA MONTENEGRO, Diretor do HOSPITAL NAVAL MARCÍLIO DIAS, pela deferência e especial incentivo à pesquisa no âmbito da saúde naval.

Ao Ilmº Sr. CMG (CD) RICARDO DE BRITO MENDEZ, Diretor da ODONTOCLÍNICA CENTRAL DA MARINHA, pela deferência e suporte à finalização deste curso e pelo empenho na condução de nossa querida OCM.

Ao Ilmº Sr. CMG (CD) LUIZ AUGUSTO DE AZEVEDO JUNIOR, Vice-Diretor da ODONTOCLÍNICA CENTRAL DA MARINHA, pela demonstração de amizade e respeito, pelo imensurável apoio que sempre nos tem dispensado.

Ao Ilmº Sr. CMG (CD-RM1) RONALDO JOSÉ JACONIANO MARTINS, Ex-Diretor da ODONTOCLÍNICA CENTRAL DA MARINA, pela amizade e confiança, direcionamento e expressivo empenho para que realizássemos este curso.

Ao Ilmº Sr. CMG (CD-RM1) PAULO SÉRGIO ASSUNÇÃO, Ex-Diretor da ODONTOCLÍNICA CENTRAL DA MARINHA, pela profunda e antiga amizade, pelo direcionamento, confiança e força que sempre nos tem transmitido; minha admiração pelo incentivo e dedicação ao Ensino na Odontologia Naval.

Aos Ilmºs Srs. CMG (CD-RM1) LUÍS AUGUSTO LOPES SCHETTINI e CMG (CD-RM1) LUIZ HOMERO GOMES DE FARIAS, Ex-Diretores da ODONTOCLÍNICA CENTRAL DA MARINHA, pelo apoio à continuidade deste curso.

Ao Ilmº Sr. CMG (CD-RM1) EDSON ANTÔNIO DE ALMEIDA, prezado pela extrema confiança em nós depositada, incentivo e vigoroso empenho para nosso ingresso neste Programa de Pós-Graduação.

Ao DEPARTAMENTO DE ENSINO da ODONTOCLÍNICA CENTRAL DA MARINHA, especialmente às companheiras de trabalho, CMG (CD-RM1) SANDRA HELENA JACQUES DE LA VEGA, CF (CD) VANIA MARA MARTINS HECHT e CC (CD) RENATA CABRAL BORGES DE OLIVEIRA AMADO MARTINS, pela amizade.

À CMG (Md) DALVA MARIA CARVALHO MENDES e ao 1º SG (EF) CARLOS DE QUEIRÓS DOS SANTOS, pelo profissionalismo e dedicação ao COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA do HOSPITAL NAVAL MARCÍLIO DIAS.

Ao CB (CN) JOSÉ NADJAN DE ARAÚJO, pelo apoio constante, pela dedicação e empenho com que sempre desenvolveu os projetos que tivemos a oportunidade de conduzir na ODONTOCLÍNICA CENTRAL DA MARINHA.

Aos Ilmº Srs. CMG (CD-RM1) GILBERTO KRAUS FILHO e CMG (CD) CLÁUDIO PEREIRA, Ex-Chefes da CLÍNICA DE ENDODONTIA da ODONTOCLÍNICA CENTRAL DA MARINHA, pela amizade e inestimável suporte nestes tempos de ausências em função deste Curso.

À CLÍNICA DE ENDODONTIA da ODONTOCLÍNICA CENTRAL DA MARINHA, seus funcionários civis, praças e oficiais, de ontem e de hoje, pela parceria constante, pela alegria do convívio na prática clínica de atendimento.

A toda tripulação da ODONTOCLÍNICA CENTRAL DA MARINHA, do passado e do presente, que ao longo destes nossos 26 anos de efetivo serviço prestado, perfilaram-se conosco na batalha diária e real que é o diuturno atendimento e ensino em nossa querida casa.

Aos que já não se encontram entre nós, com carinhosa lembrança e profunda saudade.

Aos Professores do Curso de Aperfeiçoamento/Especialização em Endodontia da Odontoclínica Central da Marinha, CF (CD) FERNANDO SILI VILHENA, CF (CD) FLAVIO DIBLASI e CT (CD) MARCELLO GHETTI DE MELO, pela constante demonstração de espírito de equipe, desprendimento, esforço e dedicação.

A todos os meus sempre estimados e inesquecíveis ALUNOS, civis e militares, por me proporcionarem a oportunidade de dividir conhecimentos e enriquecer minha vida como um todo; por suas demonstrações de amizade, respeito e carinho.

À MULHER MILITAR da MARINHA DO BRASIL, pioneira, incansável batalhadora, mãe, esposa, profissional, que graciosamente, soma e engrandece nosso querido PAÍS; às minhas colegas de vida militar, por compartilhar alegrias e frustrações, pela palavra que edifica e pelo companheirismo diário.

Aos estimados professores de ENDODONTIA, que acreditaram no meu potencial de ensino e sempre me apoiaram, em especial ao Prof Dr. MARCOS CESAR PIMENTA DE ARAÚJO, Prof. HÉLIO PEREIRA LOPES, Prof. Dr. JOSÉ FREITAS DE SIQUEIRA JUNIOR, Prof. Dr. MAURÍCIO SANTA CECÍLIA e Prof. Dr. EDSON JORGE LIMA MOREIRA.

Ao entusiasmado grupo de professoras de ENDODONTIA da UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE, Profª. Dra. ISABEL COELHO GOMES CAMÕES, Profª. LILIAN FERREIRA FREITAS e Profª. Dra. CINTHYA GOMES, que sempre compartilham conosco a alegria e a beleza do ensino de nossa especialidade.

À Prof^a. Dra. LUCIANA DE MOURA SASSONE, pelo desprendimento, simplicidade e carinho com que compartilha seus conhecimentos, pela amizade e consideração.

À Prof^a. Dra MAGDA FEREZ, Coordenadora da PÓS-GRADUAÇÃO da UNIVERSIDADE DE GUARULHOS, pela receptividade, oportunidade de partilhar seus conhecimentos e pelo suporte laboratorial na condução de parte desta pesquisa.

À Bióloga IZILVÂNIA BARRETO, funcionária do LABORATÓRIO de PESQUISA de PÓS-GRADUAÇÃO da UNIVERSIDADE DE GUARULHOS, pela imensurável participação durante parte da etapa laboratorial deste trabalho.

Aos meus queridos COLEGAS de TURMA de GRADUAÇÃO da FO-UFRJ, no 30º ANIVERSÁRIO de nossa formatura, pelo privilégio de pertencer a este grupo tão especial e ter compartilhado tantos preciosos anos de nossas vidas; pela alegria de estarmos sempre celebrando nossas vitórias e conquistas na Odontologia.

Aos meus estimados COLEGAS da MARINHA do BRASIL que me honraram com suas presenças na defesa desta tese: CMG (CD-RM1) GILBERTO KRAUS FILHO, CF (CD) JOSÉ ROBERTO OLEINISCKY, CF (CD) FERNANDO SILI VILHENA, CF (CD) FLAVIO DIBLASI, CT (CD) ALESSANDRO RODRIGO MAGGIONI, CT (CD) MARCELLO GHETTI DE MELO, CT (CD) LAURA SYLVIA DE SOUZA E MELLO, CT (CD) GRAZIELA LOPES DA SILVEIRA e 1ºTen (CD) PATRÍCIA VITAL LOPES.

Aos prezados colegas que dão continuidade à presença de nossa querida MARINHA do BRASIL na PÓS-GRADUAÇÃO da FOP-UNICAMP, pelo carinho de suas presenças na defesa desta tese, CC (CD) MARCO AURÉLIO CARVALHO DE ANDRADE e CT (CD) ISABELA MARIA DE CARVALHO CRUSOÉ SILVA.

À minha querida prima-irmã CLAUDIA MENDONÇA DA ROSA, exemplo de vigor e superação, saudades de nossa infância, carinho e amor irrestritos.

À minha querida amiga GEISA DE LIMA COUTINHO, pelo incondicional suporte profissional, pessoal e espiritual.

Aos meus queridos PACIENTES, com carinho e estima, pela verdadeira paciência, apoio ao meu desenvolvimento técnico-profissional, e incontestável fidelidade.

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram: investigar microbiologicamente, por método de cultura e pelo método do *Checkerboard* DNA-DNA *hybridization*, canais radiculares antes (C1) e após preparo químico-mecânico (C2); e, analisar radiograficamente, lesões periapicais induzidas em dentes de cães, avaliando a possível relação entre comprimento de dente e tamanho de lesão periapical. Foram utilizados 21 pré-molares inferiores de quatro cães. Os dentes foram acessados, as polpas removidas e permaneceram expostos ao meio oral por 120 dias. Após este período, as imagens das reações periapicais induzidas foram avaliadas pelo *software* Imagelab 2.4, mensurando área e perímetro. O preparo químico-mecânico foi procedido, sendo os dentes divididos em três diferentes grupos, de acordo com a substância química-auxiliar testada: G1- NaCl 0,09%; G2- Clorexidina 2% gel; e G3- NaOCl 5,25% + EDTA 17%. Em cada uma das amostras foi investigada a microbiota por método de Cultura que propicia crescimento de bactérias anaeróbias estritas; e, a presença de até 40 espécies bacterianas foi investigada pela técnica de *Checkerboard* DNA-DNA *hybridization*. As médias das áreas das imagens radiográficas das lesões foram de 0,06 cm², para os segundos pré-molares, 0,12 cm² para os terceiros pré-molares e 0,18 cm² para os quartos pré-molares. Houve associação entre os dentes de maior comprimento com as maiores áreas de lesão periapical. Em C1 foram isoladas 60 bactérias cultiváveis, pertencendo a 32 diferentes espécies, variando de 0 a 9 espécies por canal, sendo 70% anaeróbios facultativos e 18% anaeróbios estritos, com predomínio de Gram-positivos (73%). Os gêneros bacterianos mais freqüentemente isolados foram: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Neisseria*, *Propionibacterium*, *Actinomyces* e *Prevotella*. Pelo *Checkerboard* foram detectadas 158 bactérias, pertencendo a 29 diferentes espécies, variando de 0 a 19 espécies por canal, sendo 67% anaeróbios estritos, com predomínio de Gram-negativos (67%). Os microrganismos mais frequentemente encontrados foram *Campylobacter gracilis*, *Capnocytophaga sputigena*, *Leptotrichia bucallis*, *Prevotella intermedia*, *Streptococcus gordonii* e *Gemella morbilorum*. Em C2 todos os canais apresentaram ausência de crescimento microbiano pela Cultura, porém, pelo *Checkerboard* foram detectadas 33 bactérias, pertencentes a 9 diferentes gêneros e 11 diferentes espécies, variando de 1 a 8 por canal, em 10 dos 21 dentes analisados. *Gemella morbilorum*, *Capnocytophaga sputigena*, *Leptotrichia bucallis* e

Fusobacterium nucleatum sp. *Polymorphum* (não detectada em C1), foram detectadas com maior frequência após o preparo químico mecânico. No G1 houve uma redução 89% de células bacterianas. A utilização de clorexidina gel 2% (G2) e do NaOCl 5,25 (G3) permitiram redução de 97% e 99%, respectivamente, não diferindo entre si, ao nível de significância de 5%. Concluiu-se que, a microbiota de canais radiculares de dentes de cães com lesão periapical induzida, por exposição ao meio oral, após 120 dias, apresenta grande número de espécies; que o preparo químico mecânico promoveu uma grande redução de microrganismos; e que os resultados sugerem existência de relação positiva entre comprimento de dente e tamanho de lesão periapical.

Palavras-chave: radiografia, microrganismos, endodontia, inflamação.

ABSTRACT

The objectives of this study were: to investigate, by Culture and by Checkerboard DNA-DNA hybridization, microorganisms from infected root canals before (S1) and after chemomechanical preparation (S2), and analyse radiographically induced periapical lesions in dog's teeth, for a possible relation between tooth length and lesion size. Twenty one lower premolars of four mongrel dogs were used. Their chambers were accessed and their pulps removed and left open to the oral environment for the total period of 120 days. The radiographs were evaluated by Imagelab 2.4 software to measure the area and perimeter images of the induced periapical lesions. Chemomechanical preparation was proceeded, the teeth were assigned to three groups, according to the substance tested: G1- NaCl 0.09%; G2- chlorhexidine gel 2%; G3-. NaOCl 5.25% + EDTA 17%. Methodology for handling, culture and incubation for growth of strict anaerobe species was used; and, 40 bacterial species were investigated in each one of the samples by Checkerboard DNA-DNA hybridization. Measurements of the radiographic image data of the lesions were 0.06 cm² for the second premolars, 0.12 cm² for the third premolars and 0.18 cm² for the fourth premolars. There was a positive association between tooth length and size of periapical lesion. In S1, a total of 60 cultivable isolates were recovered from 32 different species, ranging from 0 to 9 per canal. Facultative anaerobe species comprised 70% of the samples and 18% were strict anaerobic species with one microbiota predominantly Gram-positive (73%). The most frequent genera recovered from the canals were: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Neisseria*, *Propionibacterium*, *Actinomyces* and *Prevotella*. One hundred and fifty eight bacteria were detected from 29 different species, ranging from 0 to 19 per canal. Strict anaerobe species comprised 67% of the samples with one microbiota predominantly Gram-negative (67%). The most frequent species detected by Checkerboard from the canals (S1) were: *Campylobacter gracilis*, *Capnocytophaga sputigena*, *Leptotrichia bucallis*, *Prevotella intermedia*, *Streptococcus gordonii* e *Gemella morbilorum*. In S2, no microbial growth was observed by culture. However, by checkerboard, 33 bacteria were detected, from 9 different genera and 11 different species, ranging from 1 to 8 per canal, in 10 of the 21 investigated teeth. *Gemella morbilorum*, *Capnocytophaga sputigena*, *Leptotrichia bucallis* e *Fusobacterium nucleatum* sp. *Polymorphum* (not detected in S1), were detected with higher frequency after

chemomechanical preparation. There was 89% of bacteria reduction in G1. Use of chlorhexidine gel 2% (G2) and NaOCl 5.25% (G3) allow bacteria reduction of 97% and 99%, respectively, with no statistical difference, with 5% significance. In conclusion, the root canal microbiota of dog teeth with induced periapical lesion, by exposure to the oral environment, after 120 days presents a great number of different species; results suggest positive relationship between the tooth length and size of the periapical lesion.

Keywords: radiography, microorganisms, endodontics, inflammation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Aspectos clínicos: A- Antes da profilaxia com ultra-som; B- Após a profilaxia com ultra-som.	53
FIGURA 2	Aspectos clínicos da indução de reação periapical com auxílio de microscópio operatório clínico.	54
FIGURA 3	Aspectos da abertura coronária: A- Ponto de eleição; B- Forma de contorno; C- Forma de conveniência.	56
FIGURA 4	Aspecto de radiografia periapical inicial.	57
FIGURA 5	Aspectos clínicos da descontaminação da câmara coronária: A- Câmaras coronárias preenchidas com detritos; B- Remoção de detritos de câmara coronária com sonda exploradora; C- Procedimento de descontaminação da câmara coronária.	61
FIGURA 6	Aspecto clínico da coleta das amostras microbiológicas.	63
FIGURA 7	Aspecto radiográfico de lesões periapicais induzidas.	68
FIGURA 8	Aspecto de mensuração de imagem radiográfica de lesão periapical utilizando o <i>software</i> Imagelab.	68
FIGURA 9	Processamento microbiológico das amostras para Cultura: A- Diluição seriada da amostra; B- Inoculação em placas de agar-sangue; C- Incubação em câmara de anaerobiose.	70
FIGURA 10	Fases da identificação microbiana por Cultura: A- Aspecto de cultura primária; B- Placa com cultura primária posicionada em lupa estereoscópica para visualização das diferentes características morfológicas das colônias de microrganismos; C- Estufa de O ₂ ; D- Câmara de anaerobiose; E- Cultura pura; F- Gram; G- Catalase; H- <i>Kit</i> de identificação bioquímica.	73
FIGURA 11	Procedimentos para a extração do DNA das amostras: A- Tubos tipo <i>Eppendorf</i> contendo as amostras; B- Extração do sobrenadante através de centrifugação; C- Fervura das amostras para extração do DNA; D- Tubos tipo <i>Eppendorf</i> contendo o DNA bacteriano extraído.	75
FIGURA 12	Representação gráfica do <i>Minislot</i> 30® e resumo da preparação e deposição das amostras nas canaletas do <i>Minislot</i> 30®, sobre a membrana de <i>nylon</i> (Técnica do <i>Checkerboard</i> DNA-DNA <i>Hybridization</i>).	76

FIGURA 13	Colocação das amostras na membrana de <i>nylon</i> : A- Remoção de alíquota contendo suspensão do DNA microbiano; B- Deposição das amostras nas canaletas do <i>Minisolt 30®</i> , sobre a membrana de <i>nylon</i> .	77
FIGURA 14	Representação gráfica do <i>Miniblotter 45®</i> e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas (Técnica do <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>).	78
FIGURA 15	Hibridização das membranas com as sondas de DNA: A- Tubos tipo <i>Eppendorf</i> contendo as sondas de DNA; B- Colocação das sondas de DNA perpendicularmente às amostras já previamente fixadas, na membrana de <i>nylon</i> , no <i>Miniblotter 45®</i> .	81
FIGURA 16	Representação gráfica do padrão das sondas de DNA com as bactérias presentes nas amostras dos canais radiculares em forma de tabuleiro de xadrez (Técnica do <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>).	81
FIGURA 17	Aspecto do aparato, contendo o <i>Miniblotter 45®</i> e a membrana com as sondas e o DNA das amostras bacterianas fixado, colocado em saco plástico umedecido.	82
FIGURA 18	Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de canais radiculares e as sondas de DNA (Técnica do <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>).	84
FIGURA 19	Média e desvio padrão do comprimento real de trabalho (CRT) dos elementos dentais analisados.	87
FIGURA 20	Média e desvio padrão das áreas das lesões periapicais induzidas associadas aos elementos dentais analisados.	88
FIGURA 21	Médias e desvio padrão dos perímetros das lesões periapicais induzidas associadas aos elementos dentais analisados.	89
FIGURA 22	Distribuição de microrganismos, por canal radicular, em 21 dentes de cães com lesão periapical induzida, isolados através do Método de Cultura microbiana, na coleta inicial (C1).	91
FIGURA 23	Frequência de espécies Gram-positivas e Gram-negativas e distribuição dos tipos morfológicos quanto à coloração de Gram em canais de cães, isoladas através do Método de Cultura microbiana, na coleta inicial (C1) (n=60).	92
FIGURA 24	Prevalência dos gêneros bacterianos em 21 canais de dentes de cães com lesão periapical induzida, isolados através do Método de Cultura microbiana, na coleta inicial (C1).	93
FIGURA 25	Prevalência dos gêneros bacterianos em 21 canais de dentes de cães com lesão periapical induzida, detectados através do Método de <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i> , nas coletas iniciais (C1).	95
FIGURA 26	Distribuição de microrganismos, por canal radicular, em 21 dentes de cães com lesão periapical induzida, detectados através do Método de <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i> , nas coletas iniciais (C1).	96

FIGURA 27	Frequência de espécies Gram-positivas e Gram-negativas e distribuição dos tipos morfológicos quanto à coloração de Gram em 21 canais de cães, detectadas através do Método de <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i> , nas coletas iniciais (C1) (n=158).	97
FIGURA 28	Prevalência dos gêneros bacterianos em 21 canais de dentes de cães com lesão periapical induzida, detectados através do Método de <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i> , na coleta inicial (C1).	98
FIGURA 29	Prevalência dos gêneros bacterianos em 21 canais de dentes de cães com lesão periapical induzida, detectados através do Método de <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i> , após o preparo químico-mecânico (C2).	100
FIGURA 30	Distribuição de microrganismos por canal radicular, em 21 dentes de cães com lesão periapical induzida, detectados através do Método de <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i> , após preparo químico-mecânico (C2).	101
FIGURA 31	Frequência de espécies Gram-positivas e Gram-negativas e distribuição dos tipos morfológicos quanto à coloração de Gram em canais de cães, detectadas através do Método de <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i> , após o preparo químico-mecânico (C2) (n=33).	102
FIGURA 32	Prevalência dos gêneros bacterianos detectados em 21 canais de dentes de cães com lesão periapical induzida, após preparo químico-mecânico (C2).	103
FIGURA 33	Comparação entre a presença de cepas bacterianas, distribuídas em gêneros, antes (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2) dos canais radiculares, detectadas pelo <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i> .	107
FIGURA 34	Redução do número de células, detectadas através do <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i> , após preparo químico-mecânico (C2) com diferentes substâncias auxiliares.	114
FIGURA 35	Percentual de redução do número de células, detectadas através do <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i> , após preparo químico-mecânico (C2) com diferentes substâncias auxiliares.	115

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Divisão dos grupos de acordo com as substâncias químicas testadas.	64
TABELA 2	Relação das cepas empregadas para o desenvolvimento das sondas de DNA bacteriano.	79
TABELA 3	Índice utilizado para determinação do nível de microrganismos nas amostras dos canais radiculares e seus valores numéricos correspondentes.	85
TABELA 4-	Morfologia, coloração de Gram e frequência dos microrganismos isolados de 21 canais radiculares de dentes de cão, nas coletas iniciais (C1).	90
TABELA 5-	Número e percentual de espécies bacterianas, detectadas antes (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2) (Técnica do <i>Checkerboard</i> DNA-DNA <i>Hybridization</i>).	105
TABELA 6	Número e percentual de espécies bacterianas detectadas pelo <i>Checkerboard</i> em C1 e em C2, com o uso de NaCl 0,09%.	109
TABELA 7	Número e percentual de espécies bacterianas detectadas pelo <i>Checkerboard</i> em C1 e em C2, com o uso de gel de CHX 2%.	111
TABELA 8	Número e percentual de espécies bacterianas detectadas pelo <i>Checkerboard</i> em C1 e em C2, com o uso de NaOCl 5,25%.	113
TABELA 9	Número de células bacterianas detectadas pelo <i>Checkerboard</i> antes (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2), nos dentes avaliados.	115
TABELA 10	Número ($\times 10^5$) de células bacterianas detectadas pelo <i>Checkerboard</i> em C1 e em C2, com as diferentes substâncias auxiliares.	117

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. MICROBIOTA DE CANAIS RADICULARES DE DENTES HUMANOS COM LESÃO PERIAPICAL	5
2.2. MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA	12
2.2.1. MÉTODO DA CULTURA DE MICRORGANISMOS	13
2.2.2. MÉTODOS MOLECULARES	15
2.2.2.1. MÉTODO DO <i>CHECKERBOARD</i> DNA-DNA <i>HYBRIDIZATION</i>	17
2.3. IMPORTÂNCIA DO PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO	19
2.3.1. HIPOCLORITO DE SÓDIO	21
2.3.2. CLOREXIDINA	24
2.4. IMPORTÂNCIA DO MODELO ANIMAL CÃO NA ENDODONTIA	28
2.4.1. ASPECTOS ANATÔMICOS E FUNCIONAIS DA DENTIÇÃO DO CÃO	35
2.4.2. MÉTODOS DE INDUÇÃO DE LESÃO PERIAPICAL NO MODELO ANIMAL CÃO	37
2.5. AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA DE LESÕES PERIAPICAIS	39
2.6. MICROBIOTA ORAL DO CÃO	41
2.6.1. DIFERENÇAS ENTRE OS MICRORGANISMOS IDENTIFICADOS EM CÃES E A MICROBIOTA HUMANA	45
3. PROPOSIÇÃO	47
4. MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1. SELEÇÃO DOS CÃES E AMOSTRAS	49
4.2. ANESTESIA	50
4.3. CRONOGRAMA DO EXPERIMENTO POR CÃO	51
4.3.1. 1ª INTERVENÇÃO	51
4.3.2. INTERVENÇÕES DE CONTROLE CLÍNICO E RADIOGRÁFICO	51
4.3.3. 2ª INTERVENÇÃO	51
4.4. INDUÇÃO DAS LESÕES PERIAPICAIS (1ª INTERVENÇÃO)	52
4.4.1. FASE INICIAL DO EXPERIMENTO	52
4.4.2. INDUÇÃO DAS LESÕES PERIAPICAIS	54
4.5. INTERVENÇÕES DE CONTROLE CLÍNICO E RADIOGRÁFICO	58

4.6. PROCEDIMENTOS CLÍNICOS (2ª INTERVENÇÃO)	58
4.6.1. PROTOCOLO PARA COLETA DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	59
4.6.2. COLETA MICROBIOLÓGICA INICIAL (C1)	59
4.6.3. PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO E DIVISÃO DOS GRUPOS	63
4.6.4. COLETA MICROBIOLÓGICA APÓS PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO (C2)	65
4.6.5. OBTURAÇÃO DOS CANAIS E SELAMENTO CORONÁRIO	66
4.7. ANÁLISE RADIOGRÁFICA DAS LESÕES PERIAPICAIS INDUZIDAS	67
4.8. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DOS CANAIS RADICULARES	69
4.8.1. IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA PELA TÉCNICA DA CULTURA	69
4.8.1.1. INOCULAÇÃO E INCUBAÇÃO	69
4.8.1.2. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA	72
4.8.2. IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA PELA TÉCNICA DO <i>CHECKERBOARD</i> DNA-DNA HYBRIDIZATION	74
4.8.2.1. EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO	74
4.8.2.2. COLOCAÇÃO DAS AMOSTRAS NA MEMBRANA DE <i>NYLON</i>	75
4.8.2.3. HIBRIDIZAÇÃO DA MEMBRANA COM AS SONDAS DE DNA	77
4.8.2.4. DETECÇÃO DAS ESPÉCIES	82
4.9. ANÁLISE DOS DADOS	85
5. RESULTADOS	87
5.1. ANÁLISE CLÍNICA E RADIOGRÁFICA DAS LESÕES PERIAPICAIS INDUZIDAS	87
5.1.1. ANÁLISE CLÍNICA	87
5.1.2. ANÁLISE RADIOGRÁFICA DAS LESÕES PERIAPICAIS	88
5.2. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DOS CANAIS RADICULARES PELA TÉCNICA DA CULTURA	89
5.2.1. COLETA INICIAL (C1)	89
5.2.2. COLETA APÓS O PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO (C2)	93
5.3. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DOS CANAIS RADICULARES PELA TÉCNICA DO <i>CHECKERBOARD</i> DNA-DNA HYBRIDIZATION	94
5.3.1. COLETA INICIAL (C1)	95
5.3.2. COLETA APÓS O PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO (C2)	99
5.3.3. ANÁLISE COMPARATIVA NA DETECÇÃO DE ESPÉCIES ANTES (C1) E APÓS O PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO (C2) DOS CANAIS RADICULARES	103

5.3.3.1. ANÁLISE QUANTO AO NÚMERO DE ESPÉCIES	104
5.3.3.2. ANÁLISE QUANTO AO NÚMERO DE CÉLULAS	114
6. DISCUSSÃO	119
7. CONCLUSÃO	135
REFERÊNCIAS	137
ANEXO 1 - Certificado de Aprovação do Comitê de Ética na Experimentação Animal.	167
APENDICE 1 - Meio de Transporte.	169
APENDICE 2 - Meios de Cultura.	171
APENDICE 3 - <i>Kits</i> de Identificação Microbiana.	183
APENDICE 4 - Aspectos microbiológicos (identificação por Cultura) e radiográficos de 21 dentes investigados.	197
APENDICE 5 - Aspectos microbiológicos (identificação por <i>Checkerboard</i>) e radiográficos de 21 dentes investigados.	201
APENDICE 6 - Aspectos microbiológicos (identificação por <i>Checkerboard</i>) e radiográficos após preparo químico-mecânico de 21 dentes investigados.	212

1. INTRODUÇÃO

Claramente, a pesquisa embasada em animais tem um papel importante no avanço dos conhecimentos da etiologia, prevenção e tratamento de doenças orais. Muitas das pesquisas clínicas apresentadas surgem, como resultado direto de dados anteriores derivados de pesquisa em animais (Bowen, 1994).

Na pesquisa com drogas ou fármacos (Lee, 1995), na área cirúrgica e de novos equipamentos, a experimentação em humanos precisa ser precedida de provas laboratoriais e da experimentação em animais (Vieira & Hossne, 1998). É, portanto, necessário suplementar as limitadas informações disponíveis de fontes humanas com aquelas da experimentação animal (Barker & Lockett, 1971).

Para ser usado como modelo experimental em pesquisa médica e odontológica, um animal deve preencher necessidades experimentais, e informações na composição e variação de sua microbiota oral devem estar disponibilizadas (Misirligil & Tuncer, 1990).

Cães são considerados excelentes animais de experimento por possuírem seus tecidos orais, especialmente o periodonto, e o tamanho de seus dentes bem similares aos do homem, embora existam diferenças anatômicas, topográficas e fisiológicas evidentes (Page & Schoroeder, 1982); além de possuírem uma taxa de crescimento rápida, o suficiente para permitir a obtenção dos resultados em períodos de tempo menores (Rowe, 1980). Os autores têm encontrado estreita similaridade nos processos de reparo dos dentes e estruturas de suporte entre humanos e cães em diversas situações clínicas (Citrome *et al.*, 1979).

Em Endodontia, o cão tem sido utilizado nas investigações de reações periapicais (Hill, 1932) e estudos de toxicidade de diferentes tipos de medicações e materiais obturadores endodônticos (Masson *et al.*, 1992). As respostas periapicais também têm sido avaliadas frente a diversos procedimentos operatórios, variando técnicas e limites de instrumentação e obturação, além de substâncias químicas auxiliares (Orbán, 1932; Dixon & Rickert, 1938; Östby, 1961; Matsumiya & Kitamura,

1960; Seltzer *et al.*, 1964; Snyder *et al.*, 1966; Strömberg, 1969; Davis *et al.*, 1971; Holland, 1975; Holland *et al.*, 1979a, b; West *et al.*, 1979; Allard *et al.*, 1987; Souza Filho *et al.*, 1987; Soares *et al.*, 1990a, b; Esberard, 1992; Leonardo, 1992; Leonardo *et al.*, 1994, 1995; Souza Filho *et al.*, 1996; Silveira, 1997; Berbert, 1999; Otoboni Filho, 2000; Berbert *et al.*, 2002).

Na realização desses estudos, os autores descreveram diferentes métodos para promover a infecção intra-radicular e induzir lesão periapical em dentes de cães. Alguns sugerem a abertura dos dentes para promover uma infecção natural (Souza Filho *et al.*, 1987). Outros preconizam contaminação ao meio oral por 5-7 dias e posterior selamento coronário (Berbert *et al.*, 2002). E há ainda outros que realizam um arrombamento periapical, precedendo os procedimentos anteriores (Soares, 1999). Porém, a identificação da microbiota presente nesses canais radiculares infectados somente está registrada por Ferreira *et al.*, (2002a; 2006).

Os microrganismos são os principais agentes etiológicos das infecções pulpo-periapicais (Kettering & Torabinejad, 1994; Baumgartner, 1997), sendo importante conhecê-los, para direcionar as formas de combate à infecção durante o tratamento endodôntico. A máxima eliminação de bactérias do sistema de canais radiculares propicia um ambiente favorável ao reparo das lesões periapicais (Sjögren *et al.*, 1997). Por esta razão, a Endodontia é considerada, em essência, a disciplina clínica voltada para prevenção e tratamento das infecções pulpares perirradiculares (Siqueira Jr. & Lopes 1999).

O preparo químico-mecânico do sistema de canais radiculares envolve a associação de meios mecânicos, físicos e químicos (Yamashita, 2000). O meio mecânico, representado pela ação dos instrumentos endodônticos nas paredes do canal radicular, promove a sua dilatação. Para a remoção dos restos inorgânicos e orgânicos produzidos, torna-se importante a atuação dos meios físicos (irrigação e aspiração) e químicos (soluções irrigadoras e auxiliares).

Embora o preparo químico-mecânico do canal radicular reduza significativamente os microrganismos predominantes na microbiota endodôntica (Byström & Sundqvist, 1981; Peters *et al.*, 2002), alguns microrganismos sobrevivem. Isto ocorre, não somente pela incapacidade do preparo químico-mecânico em removê-

los das complexidades anatômicas, mas também porque alguns nutrientes capazes de favorecer o crescimento destes microrganismos, ali permanecerão, propiciando a estes microrganismos condições de multiplicação e restabelecimento da contaminação pulpar (Byström *et al.*, 1985; Gomes *et al.*, 1996; Siqueira Jr. & Lopes, 1999).

A melhoria das técnicas de cultura de microrganismos anaeróbios permitiu maior detalhamento da microbiota presente nas infecções endodônticas. Entretanto, cerca de 60% dos microrganismos da cavidade oral ainda não foram cultivados (Aas *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2005).

Os estudos conduzidos através de métodos moleculares têm trazido uma quantidade imensa de novas informações para os conceitos da microbiologia endodôntica, o que indica uma necessidade urgente de reavaliação dos mesmos (Tronstad & Sunde, 2003).

A técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, descrita por Socransky *et al.*, em 1997, para detecção de microrganismos orais da placa gengival, utiliza sondas de DNA e permite identificação e quantificação de até 45 espécies de microrganismos em até 28 amostras de placa de uma única vez.

Portanto, para que haja reprodução clínica de resultados, o conhecimento da fisiologia e microbiota presente em canais radiculares de cães é de grande importância, já que este modelo animal é bastante utilizado no amplo espectro da pesquisa endodôntica. Este conhecimento é ainda mais expressivo para aqueles estudos que investigam a eficácia de soluções químicas-auxiliares durante o preparo químico-mecânico, na desinfecção de canais radiculares, em dentes de cães com lesão periapical induzida, o que vem a ser o objetivo do presente trabalho.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. MICROBIOTA DE CANAIS RADICULARES DE DENTES HUMANOS COM LESÃO PERIAPICAL

As primeiras observações diretas da presença de bactérias vivas foram feitas durante o século XVII, por Antony van Leeuwenhoek, que aperfeiçoou lentes para estudar organismos vivos cujo índice de refração era próximo ao da água, aos quais denominou “pequenos animalículos”. Através de cartas enviadas à Sociedade Real de Londres, em 1683 e em 1695, van Leeuwenhoek forneceu uma descrição clara das bactérias encontradas na cavidade oral, inclusive com desenhos precisos dos três padrões morfológicos utilizados ainda hoje na descrição das mesmas – bastonetes, cocos e formas espiraladas (Evans, 1997).

Deste modo, a Microbiologia Oral foi introduzida como ciência, sendo as bactérias da cavidade oral humana os primeiros microrganismos que foram descritos a uma sociedade científica (Uzeda, 2002).

A cavidade oral compreende muitas superfícies, cada uma delas coberta com uma profusão de bactérias, o conhecido biofilme bacteriano. Mais de 700 espécies bacterianas ou filotipos, das quais mais de 50% não foram cultivadas, foram ali detectadas. Algumas dessas bactérias têm sido implicadas em doenças orais, tais como cárie e periodontite, que estão entre as infecções bacterianas mais comuns em humanos (Aas *et al.*, 2005).

Remonta há cerca de um século, mais precisamente em 1894, o primeiro relato na literatura referente ao papel dos microrganismos nas doenças pulpares e periapicais. Willoughby Dayton Miller, um célebre microbiologista americano, considerado o pai da Microbiologia Oral, demonstrou, então, por meio de material coletado de canais radiculares, a associação entre bactérias e as patologias pulpares e perirradiculares (Siqueira Jr., 1997). Em sua análise bacteriológica de esfregaços obtidos de 250 amostras de canais radiculares com polpas necróticas, Miller identificou

vários tipos morfológicos de bactérias (cocos, bacilos e espirilos), constatando que as infecções endodônticas eram mistas e que, depois de transcorrido longo tempo de infecção, havia uma maior concentração bacteriana e uma maior diversidade de espécies do que em infecções iniciais. Além disto, observou que muitas das bactérias não foram cultiváveis pelas técnicas disponíveis naquela época (Miller, 1894).

Somente em 1965 os achados de Miller foram confirmados, com a publicação de trabalho clássico na literatura endodôntica, de autoria de Kakehashi *et al.*, que investigaram a correlação e a importância de microrganismos com a etiologia das patologias pulpare. Para tal, desenvolveram trabalho em 36 ratos, com sete semanas de idade, dos quais 15 eram animais convencionais e 21 eram *germ-free*. O primeiro molar superior direito de cada um dos animais foi exposto ao meio oral com uso de uma broca carbide número ½, montada em peça de mão. Os animais foram mortos após intervalos pós-operatórios de 1 a 42 dias. Um bloco do quadrante superior direito foi removido, processado em cortes seriados que foram e corados pelas técnicas hematoxilina-eosina, tricômico de Masson, Giemsa e Brown e Brenn, para análise microscópica. Os autores observaram que todos os preparos cavitários apresentavam-se impactados com alimentos e debris. No grupo dos ratos convencionais, os espécimes obtidos após o oitavo dia do experimento apresentaram tecido pulpar vital apenas no terço apical das raízes, a porção coronária apresentava-se necrótica e purulenta, com frequente observação de colônias de microrganismos. Após o oitavo dia, todos os espécimes do grupo de animais convencionais apresentaram necrose pulpar completa com tecido inflamatório crônico na porção coronária e formação de abscessos nas áreas apicais. Dos 21 animais *germ-free*, 18 sobreviveram aos procedimentos operatórios. Contrastando com o grupo dos animais convencionais, não foram encontradas polpas sem vitalidade, granulomas periapicais ou abscessos no grupo dos *germ-free*. Nestes, a inflamação pulpar, resultante da exposição, foi mínima. Aos 14 dias a formação de barreira dentinária já foi evidente, com observação de proeminentes quantidades de matriz. Os espécimes com maior tempo de experimento apresentaram tecido pulpar remanescente vital abaixo de completa ponte dentinária que selava a exposição.

Devido ao desconhecimento das técnicas de anaerobiose, os microrganismos predominantemente isolados dos canais radiculares com polpas necrosadas, antes de meados dos anos 70, eram bactérias anaeróbias facultativas do grupo dos estreptococos, os enterococos, micrococos, difteróides, estafilococos, lactobacilos, bactérias entéricas e as espécies *Candida*, *Neisseria* e *Veillonella* (Morse, 1987).

Impulsionada pelo desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas de transporte, isolamento e cultivo de anaeróbios estritos, na década de 70 a Endodontia então, como ciência, obteve um grande avanço. Considerável interesse foi gerado quanto ao papel desses microrganismos na patogênese das doenças endodônticas (Siqueira Jr. & Lopes, 1999).

Sundqvist, em 1976, confirmou o papel importante desempenhado por bactérias na etiologia das lesões periapicais, assim como combateu o conceito de que o tecido pulpar necrosado, embora estéril, é um irritante tecidual. Avaliou as condições bacteriológicas de 32 canais de dentes unirradiculares com polpas necrosadas em decorrência de trauma dentário, com coroas híginas, sem cárie ou restaurações. Não havia doença periodontal ou presença de fístulas. Bactérias foram encontradas apenas em 18 dos 19 casos em que foi registrada presença de lesão periapical associada. Do total de 88 cepas bacterianas isoladas apenas 5 foram anaeróbias facultativas. Desta forma, mais de 90% das cepas bacterianas isoladas foram anaeróbias estritas. As bactérias mais freqüentemente isoladas foram: *Bacteroides melaninogenicus*, fusobactérias, eubactérias e peptostreptococos. O número de espécies no interior dos canais variou de 1 a 12. Houve uma correlação positiva entre o tamanho da lesão perirradicular e a densidade e o número de espécies bacterianas presentes no canal. Nos dentes com inflamação periapical aguda, havia uma maior quantidade de microrganismos e, seus sinais e sintomas estavam associados à presença de uma espécie bacteriana, que naquela época era denominada *Bacteroides melaninogenicus*.

Zavistoski *et al.*, em 1980, descreveram técnica para obtenção de cultura quantitativa em amostras endodônticas. O método foi utilizado em 10 dentes não vitais, demonstrando uma média de concentração de $10^{7.7}$ bactérias por grama de amostra, compatível com a concentração bacteriana encontrada em outros sítios anatômicos na

presença de infecção. Nove espécimes continham uma microbiota aeróbia-anaeróbia mista e havia uma média de 6 diferentes espécies bacterianas por canal, em concentrações que excediam 10^5 /g. Do total de microrganismos isolados, 2/3 foram de anaeróbios. Os resultados indicaram que dentes com polpas não vitais contêm ampla população bacteriana, tanto em número de espécies quanto em concentração total dessas espécies. Esses achados apoiaram o conceito de que bactérias podem desempenhar papel colaborador na doença endodôntica.

Esses achados foram confirmados posteriormente por Byström & Sundqvist (1983); Sundqvist (1992); Sundqvist (1994); Gomes *et al.* (1994a,b; 1996a,b,c) pela constatação da prevalência de bactérias anaeróbias estritas nos canais radiculares infectados.

Baumgartner & Falkler (1991) isolaram e identificaram bactérias presentes nos 5 mm apicais de canais radiculares de 10 dentes recém-extraídos com exposições pulpares por cárie e lesão periapical, e relataram que 68% dos microrganismos isolados foram anaeróbios estritos. As bactérias mais proeminentes cultivadas foram *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* produtores de pigmento negro, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides* não produtores de pigmento negro, *Veillonella*, *Enterococcus faecalis*, e *Streptococcus mutans*.

Lomçali *et al.*, em 1996, estudaram na microscopia eletrônica de varredura os ápices de dentes com lesões periapicais crônicas. Zonas de reabsorção, bactérias e leveduras foram freqüentemente observadas nas superfícies radiculares. Placa bacteriana periapical e uma estrutura polida estavam presentes principalmente ao redor do forame apical maior. Depósitos de um tecido semelhante a cimento indicativo de reparo foram vistos próximos a algumas áreas de reabsorção. Observaram ainda células clásticas fortemente aderidas a depressões semelhantes a crateras. Os autores sugeriram que microrganismos de um canal radicular infectado podem com sucesso invadir os tecidos periapicais, podendo ser um significativo fator etiológico na patologia periapical.

As infecções de canais radiculares possuem uma natureza que difere das apresentadas na cárie dental ou na periodontite, pois se estabelecem em

compartimento da cavidade oral que, originariamente, apresentava-se estéril (Chávez de Paz, 2007).

Outro aspecto que é ressaltado é o de que, embora na cavidade oral existam aproximadamente 10^{10} bactérias (Mims *et al.*, 1995) e todas tenham oportunidade de invadir o espaço do canal radicular, apenas um grupo restrito de espécies tem sido identificado em canais radiculares infectados (Kantz & Henry, 1974; Wittgow & Sabiston, 1975; Sundqvist, 1994; Gomes, 1995). A literatura endodôntica é incisiva em afirmar que as infecções por microrganismos anaeróbios estritos ocorrem na presença de tecido necrótico, suprimento sanguíneo tecidual comprometido ou após infecção por aeróbios e anaeróbios facultativos capazes de diminuir o potencial de oxirredução nos tecidos e promover interações positivas e antagônicas entre as bactérias. Portanto, dentre os fatores que promovem a seleção das bactérias nos canais radiculares estão os fatores nutricionais, baixo potencial de óxido-redução, pH, temperatura, interações positivas e antagonismos entre bactérias, resistência do hospedeiro e presença de antimicrobianos e inibidores. Estes fatores tendem a favorecer o crescimento de espécies anaeróbias (Bergenholtz & Crawford, 1989; Marsh & Martin, 1992; Sundqvist, 1992; Sundqvist, 1994; Gomes *et al.*, 1994a,b; 1996a,b,c).

Certas espécies bacterianas anaeróbias estritas parecem estar envolvidas com o desenvolvimento de alguns aspectos clínicos de origem endodôntica (Sundqvist, 1976; Yoshida *et al.*, 1987; Gomes *et al.*, 1994a, 1996a).

Os bacilos produtores de pigmento negro, como *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis* degradam proteínas séricas tornando os peptídeos e amino-ácidos disponíveis para fermentação (Sundqvist *et al.*, 1985). A degradação de proteínas por essas espécies torna possível o crescimento de bactérias que dependem da disponibilidade de peptídeos, como por exemplo, as eubactérias, fusobactérias e peptostreptococos, que produzem peptidases, mas não são capazes de degradar proteínas intactas (Jansen & van der Hoeven, 1997). Esse sinergismo é importante para a capacidade desses microrganismos de induzirem a formação de abscessos periapicais (Sundqvist, 1976). Têm sido feitas correlações entre as combinações de *Peptostreptococcus micros* com

Prevotella intermedia ou *Porphyromonas endodontalis* na formação de abscessos periapicais (Sundqvist, et al., 1979).

Em 1994, Sundqvist, conduziu revisão sobre a taxonomia, ecologia e patogenicidade da flora do canal radicular. Relacionou as bactérias que até então tinham sido por ele isoladas em canais radiculares de dentes com as paredes das câmaras pulpares intactas (Sundqvist, 1976; Byström & Sundqvist, 1981; Byström & Sundqvist, 1983; Sundqvist et al., 1989). Concluiu que a espécie mais freqüentemente isolada foi o *Fusobacterium nucleatum* (48%), que naquela época havia sido subdividido em três subespécies: *nucleatum*, *polymorphum* e *vincentii* (Dzink et al., 1990). Nenhuma identificação ao nível destas subespécies tinha sido feita nos isolados dos canais radiculares. *Streptococcus anginosus* (incluindo espécies anteriormente identificadas como *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius* e *Streptococcus milleri*) e *Streptococcus mitis* foram as espécies estreptocócicas (40%) mais freqüentes. Somadas, as espécies peptoestreptocócicas foram as bactérias mais comuns: *Peptostreptococcus micros* (34%) e *Peptostreptococcus anaerobius* (31%), estavam presentes em mais de um terço das amostras e freqüentemente estavam juntas. Dos bacilos anaeróbios produtores de pigmento negro a *Prevotella intermedia* (34%) foi a presença mais comum. *Prevotella loescheii* e *Prevotella denticola* estavam presentes em 6% dos canais, respectivamente. Das espécies produtoras de pigmento negro assacarolíticas, *Porphyromonas endodontalis* ocorreu com mais freqüência (9%) do que *Porphyromonas gingivalis*, que foi um membro um tanto infrequente na microbiota dos canais radiculares. Foram registrados ainda *Bacteroides* sp. (35%), *Eubacterium alactolyticum* (34%) *Eubacterium lentum* (31%) e *Lactobacillus* sp. (32%). *Actinomyces israelii* estavam presentes em 11% dos canais. O autor ressaltou que bactérias anaeróbias, como *Pseudomonas aeruginosa*, são raramente encontradas inicialmente em canais radiculares infectados, mas podem ser introduzidas durante o tratamento.

Algumas espécies aeróbias ou anaeróbias facultativas estão associadas a infecções persistentes do canal radicular podendo comprometer o sucesso da terapia endodôntica. Dentre estas se destacam os estreptococos, *Enterococcus faecalis*,

Pseudomona aeruginosa e *Candida* spp. (Ensgström & Frostell, 1964; Ranta *et al.*, 1988; Sundqvist *et al.*, 1998).

O *Enterococcus faecalis* tem sido um dos poucos microrganismos anaeróbios facultativos associados à periodontite apical persistente (Ensgström & Frostell, 1964; Haapasalo *et al.*, 1983; Pinheiro *et al.*, 2003a,b), aos casos de *flare-ups* (Matusow, 1995), às infecções secundárias e aos casos de retratamento com lesões perirradiculares refratárias (Sundqvist *et al.*, 1998). À propósito, Sundqvist (1992), enfatizou que os *Enterococcus faecalis* são capazes de causar e manter infecções de difícil tratamento porque são microrganismos resistentes a uma ampla variedade de agentes antimicrobianos.

Molander *et al.* (1998) examinaram microbiologicamente 100 dentes tratados endodonticamente com lesão periapical radiograficamente evidenciadas e 20 dentes sem sinais de patologia periapical, cujo retratamento foi indicado por razões técnicas. Cento e dezessete cepas bacterianas foram isoladas em 68 dentes do grupo com patologia apical. Na maioria dos casos uma ou duas cepas foram encontradas em cada dente. As espécies anaeróbias facultativas predominaram entre todas as isoladas (69%). *Enterococcus* foi o gênero mais frequentemente isolado. Em 11 dentes do grupo sem patologia apical, nenhuma bactéria foi isolada, enquanto nos nove dentes remanescentes foram isoladas 13 espécies bacterianas. Concluíram que a microbiota dos canais obturados difere tanto qualitativamente como quantitativamente daquela encontrada nos dentes com polpa necrótica sem tratamento endodôntico. Os autores alertaram que por terem sido isolados microrganismos de dentes sem sinais de patologia periapical, do ponto de vista clínico, pode ser sugerido que todo dente tratado endodonticamente deve ser considerado como potencialmente infectado.

Está comprovado que as bactérias predominantes em infecções periapicais são as anaeróbias estritas, como por exemplo, os bacilos Gram-negativos *Porphyromonas*, *Prevotella* e *Fusobacterium* spp. Esses microrganismos estão associados ao desenvolvimento de lesões periapicais (Tani-Ishii *et al.*, 1994), bem como ao desenvolvimento de alguns aspectos clínicos de origem endodôntica (Sundqvist, 1976; Yoshida *et al.*, 1987; Nisengard *et al.*, 1997; Gomes *et al.*, 1994a; 1996a).

São também freqüentemente encontrados *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Veillonella* e *Capnocytophaga*. Menos frequentes são *Neisseria*, *Haemophilus*, *Eikenella*, *Staphylococcus*, *Mitsuokella* e *Wolinella* ssp. Os anaeróbios facultativos mais comuns são cocos, os gêneros *Enterococcus* e *Gemella*. É relatada a presença ocasional de espécies *Enterobacter*, *Bacillus*, *Tissierella*, *Campylobacter* e *Actinobacillus* ssp. *Hafnia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Aerobacter* e *Alcaligenes* ssp. São mais raramente são isolados, assim como os aeróbios *Mycobacteria*, *Nocardia*, *Mima*, *Pseudomonas* e *Micrococcus* ssp. (Baumgartner & Falkler, 1991; Sundqvist, 1994; Gomes, 1995). Espiroquetas (Thilo *et al.*, 1986; Nair, 1987), *Mycoplasma* (Serene & Anderson, 1967) e *Candida* (Sen *et al.*, 1995; Siren *et al.*, 1997) também foram isolados.

Enterococci, pseudomonas, fungos, e alguns bacilos entéricos também podem estar envolvidos em infecções persistentes ou secundárias de canal radicular (Haapasalo *et al.*, 1983; Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998).

Os microrganismos de provável significância patogênica nas infecções endodônticas incluem espécies de *Porphyromonas*, de *Prevotella*, de *Fusobacterium*, espécies do grupo de *Streptococcus anginosus*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, espécies de *Peptostreptococcus*, espécies de *Eubacterium*, e espécies de *Actinomyces* (Sundqvist, 1976; Siqueira Jr. *et al.*, 2000; Siqueira Jr. *et al.*, 2001a,b; Roças *et al.*, 2001).

2.2. MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA

Ao longo dos anos, para identificação, estudo das características e patogenicidade dos microrganismos, diferentes métodos têm sido utilizados na coleta e identificação. No entanto, apenas duas linhas de trabalhos laboratoriais existem: o método de cultura e os métodos moleculares. No primeiro, os microrganismos são coletados na amostra, em seguida são isolados e identificados através de testes

bioquímicos. Já os métodos moleculares utilizam seqüências de ácidos nucleicos para a identificação microbiana, sendo a porção 16S RNA a mais utilizada nos estudos moleculares, embora outros estudos utilizem outros genes (Vianna, 2006).

2.2.1. MÉTODO DA CULTURA DE MICRORGANISMOS

Em 1972, Syed & Loesche avaliaram um meio de transporte para cultura de anaeróbios, que consistia de uma solução salina mineral balanceada, adicionada de ditiotreitol, além de conter sódio etilenodiamino tetracético, ao qual denominaram *Reduced Transport Fluid* (RTF). Ao comparar este meio de transporte com o VMG II e o SBL, quanto à manutenção da viabilidade da flora bacteriana presente nas amostras testadas, concluíram que o RTF, nas condições daquele experimento, não permitiu o crescimento da flora bacteriana oral, o que os levou a concluir que o RTF seria um meio satisfatório para transporte das bactérias orais presentes em amostras.

Com intuito de isolar e classificar bactérias anaeróbias, Kantz & Henry, em 1974, buscaram desenvolver um método de coleta de amostras de canais em que todo o procedimento estaria sendo conduzido em um ambiente anaeróbio. Para tal, coletaram amostras de 24 dentes não vitais com câmaras coronárias intactas, de onde isolaram 377 bactérias, onde aproximadamente 104 foram anaeróbios.

Gomes *et al.*, através de método de identificação por cultura, analisaram 30 (1994a) e 70 (1996a) casos de canais radiculares infectados. Os microrganismos mais frequentemente isolados foram *Streptococcus milleri*, *Pepstreptococcus micros*, *Streptococcus sanguis*, *Prevotella melaninogenica* e *Streptococcus angilosus*.

Lana *et al.*, em 2001, analisaram a microbiota de 31 unirradiculares com necrose pulpar, sendo 22 com coroa intacta e 9 com comunicação com a cavidade oral. Foram isolados 308 microrganismos de 27/31 (87%) canais radiculares, dos quais foram identificados 278 espécies/gêneros. O número de microrganismos isolados de cada canal variou de 1 a 11, representado por uma média de 5 espécies por canal. Dos 27 canais radiculares, 22 (81,5%) apresentaram infecção do tipo polimicrobiana. Foram

isoladas bactérias anaeróbias estritas, microaerófilas e fungos em 24 (88,9%), 14 (51,8%) e 5 (18,5%), respectivamente, das amostras clínicas. Os gênero mais freqüentemente isolados foram *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Clostridium* spp., e *Peptostreptococcus* spp. O gênero *Streptococcus* foi frequentemente associado à presença de *Prevotella* spp. e *Fusobacterium* spp.

Villanueva (2002) analisou a microbiota de 28 canais radiculares de pacientes com situação de urgência após o início da terapia endodôntica. O autor observou relação entre *Fusobacterium nucleatum* e as formas mais severas de reagrudimento entre sessões do tratamento endodôntico.

Peters *et al.* (2002) analisaram 58 canais radiculares infectados de dentes com lesão periapical, buscando investigar combinações entre as bactérias isoladas. Encontraram relações significantes entre *Prevotella intermedia* e *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella orallis*, *Actinomyces odontolyticus* e *Peptostreptococcus micros*, *Bifidobacterium* spp. e *Veillonella* spp.

Jacinto *et al.*, em 2003, analisaram microbiologicamente 70 amostras coletadas de canais radiculares de dentes com abscessos periapicais, obtendo 69 culturas positivas. Foram isoladas 352 cepas pertencendo a 69 espécies, sendo 83% anaeróbios estritos e 47,5% Gram-negativos. Um máximo de 9 espécies foram isoladas por canal radicular. *Fusobacterium necrophorum*, *Peptostreptococcus prevotti*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* / *nigrescens*, *Gemella morbilorum* e *Veillonella* spp. foram os microrganismos mais frequentemente isolados.

Chu *et al.* (2005), através do método de cultura, avaliaram se a comunicação entre a cavidade pulpar e o meio oral seria capaz de influenciar a microbiota de infecções endodônticas primárias. Dos 43 canais com câmara exposta avaliados foram isolados um total de 211 microrganismos (28 diferentes gêneros e 55 espécies), enquanto que dos 43 canais sem exposição foram isolados 185 microrganismos (28 diferentes gêneros e 54 espécies). *Fusobacterium nucleatum* e *Propionibacterium acnes* estiveram presentes em proporção semelhante nos canais com e sem

exposição. A similaridade entre as espécies encontradas indicou que a exposição da câmara pulpar não é um fator determinante para seleção da microbiota dos canais radiculares.

Siqueira Jr. (2008) afirmou que, embora mais de 60% das bactérias orais ainda não foram cultivadas, o método de cultura não perdeu relevância ou se tornou obsoleto, sendo seu valor indiscutível. Ressaltou, ainda que esforços no sentido de desenvolver estratégias para cultivo da grande maioria das bactérias ainda “não-cultiváveis” *in natura* têm sido desprendidos.

2.2.2. MÉTODOS MOLECULARES

Nas últimas décadas as técnicas moleculares têm contribuído para detecção de várias espécies, aumentando a gama da microbiota típica dos canais radiculares infectados (Vianna, 2006).

Diversas espécies previamente cultivadas, isoladas de infecções endodônticas, como *Porphyromonas endodontalis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*, têm sido detectadas em maior frequência através de métodos moleculares. A maior prevalência dessas espécies cultivadas, quando detectadas por métodos moleculares, parece estar mais relacionada à características dos mesmos, como maior sensibilidade e habilidade de identificar cepas não cultiváveis, cepas com fenótipos aberrantes e células em um estado viável, mas não cultivável (Siqueira Jr., 2008).

Munsun *et al.* (2000) coletaram amostras de 5 canais radiculares infectados e as analisaram através de técnica de cultura e do método molecular de sequenciamento do 16S rDNA. Os autores ressaltaram que métodos independentes da cultura, em que a análise é molecular, têm revelado uma microbiota associada com infecções endodônticas mais diversificada do que aquela revelada pelos métodos de cultura por si só.

A técnica do PCR (*Polimerase Chain Reaction*) tem sido bastante utilizada como método de identificação microbiana em infecções de origem endodôntica. Conrads *et al.* (1997), Jung *et al.* (2000), Siqueira Jr. *et al.* (2001a, b, c), Roças *et al.* (2001), Siqueira Jr. & Roças (2003a, b, c), Xia & Baumgartner (2003); Baumgartner *et al.* (2003); Siqueira Jr. & Roças (2004), Vianna *et al.* (2006a,b), Gomes *et al.* (2006) e Gomes *et al.* (2007) estão registrados entre os diversos autores que têm conduzido trabalhos de pesquisa utilizando esse método no campo da Endodontia.

Referindo-se ao PCR como um método genético molecular sensível e específico, Siqueira Jr. & Roças (2003c), constataram, através de sua utilização, que *Propionibacterium propionicus* foi encontrado mais frequentemente do que jamais havia sido antes descrito através de estudos por cultura, tanto em infecções primárias quanto em infecções persistentes de origem endodôntica.

Ressaltando que a ocorrência de *Actinomyces* em infecções de origem endodôntica tem sido associada a insucessos nos tratamentos, Xia & Baumgartner (2003) utilizaram o PCR para examinar o conteúdo de canais radiculares infectados e secreções aspiradas de abscessos ou celulites de origem endodôntica, objetivando investigar a presença de *Actynomices israelii*, *Actynomices naeslundii*, e *Actynomices viscosus*. Foram analisadas 131 amostras clínicas, e em 72 de 129 (55,8%) *Actynomices* foi detectado. Destes, 41 de 51 amostras (80,4%) provenientes de canais infectados, 22 de 48 (45,8%) de abscessos, e 9 de 30 (30%) associados a celulite. Os autores ressaltaram a importância da eficiência e acuidade do método PCR, ao constatarem que a ocorrência de *Actynomices* por eles encontrada foi muito maior do que acreditava-se previamente.

Baumgartner *et al.* (2003) constataram maior associação de espiroquetas a infecções de origem endodôntica do que imaginava-se até então, ao investigarem, através de PCR, amostras de 54 canais radiculares infectados e 84 amostras de secreções aspiradas de abscessos/celulites. Os espiroquetas foram detectados em 51 das 84 (60,7%) amostras de abscessos/celulite e em 20 das 54 amostras de canais infectados assintomáticos. *Treponema socranskii* foi a espécie mais frequentemente

detectada (44,9%), seguida por *Treponema maltophilum* (29,7%), *Treponema denticola* (28,9%), *Treponema pectinovorum* (13,7%) e *Treponema vincentii* (5,1%).

2.2.2.1. MÉTODO DO CHECKERBOARD DNA-DNA HYBRIDIZATION

Dentre outras técnicas moleculares existentes, destaca-se a de Socransky *et al.*, que em 1994, introduziram a técnica molecular do *Checkerboard* DNA-DNA *Hybridization*. Com ela foi possível avaliar 13.261 amostras de placa subgengival humana. A importância deste método respalda-se na capacidade de, simultânea e quantitativamente analisar até 28 amostras por placa, detectando até 40 espécies bacterianas por amostra.

Papapanou *et al.*, em 1997, compararam a técnica do *Checkerboard* DNA-DNA *Hybridization* com o método de cultura em amostras subgengivais. Os autores observaram que tal metodologia resultou em contagens bacterianas significativamente mais altas que as da cultura, para a grande maioria das espécies testadas, como *Bacteroides forsythus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*.

O método do *Checkerboard* DNA-DNA *Hybridization* também foi utilizado para análise de lesões perirradiculares (Sunde *et al.*, 2000; Gatti *et al.*, 2000). Ao utilizá-lo neste tipo de investigação, Sunde *et al.* (2000) observaram detecção de muito mais microrganismos do que quando o método de cultura para anaeróbios foi utilizado. Gatti *et al.* (2000) ressaltaram que, nesse tipo de pesquisa, o *Checkerboard* apresenta vantagem sobre outros métodos moleculares por não amplificar o DNA na amostra.

Siqueira Jr. *et al.* (2000) utilizando o método do *Checkerboard* DNA-DNA *Hybridization*, examinaram a microbiota de 28 canais radiculares infectados. As espécies mais prevalentes por eles encontradas foram *Bacteroides forsythus* (39,3%), *Haemophilus aphrophilus* (25%), *Corynebacterium matruchotii* (21,4%), *Porphyromonas gingivalis* (17,9%) e *Porphyromonas endodontalis* (17,9%). *Enterococcus faecalis*, *Capnocytophaga gingivalis*, e *Streptococcus intermedius* foram detectados em 14,3%

das amostras. Os autores não encontraram correlação entre o número de espécies encontradas e os sinais e sintomas observados nos pacientes.

Siqueira Jr. *et al.* (2001d) avaliaram a secreção purulenta aspirada de 27 casos de abscesso periapical agudo, e investigaram 49 espécies bacterianas pelo método do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. *Bacteroides forsythus* (29,6%), *Porphyromonas gingivalis* (29,6%), *Streptococcus constellatus* (25,9%), *Prevotella intermedia* (22,2%), *Fusobacterium periodonticum* (18,5%), *Fusobacterium nucleatum* sp. *nucleatum* (18,5%) e *Eukenella corrodens* (18,5%) foram as espécies mais prevalentes.

Wall-Manning *et al.* (2002) consideraram o método do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* como instrumento forte e apropriado para estudo de potenciais microrganismos encontrados na placa dental, em investigações de microrganismos cariogênicos.

Moraes *et al.* (2002) compararam a efetividade dos métodos de cultura, PCR e *Checkerboard* na detecção de *Fusobacterium nucleatum* em 13 canais radiculares infectados, com lesão perirradicular associada. A incidência detectada pelos métodos utilizados foi de 15,4% por cultura, 15,4% por PCR e 10% por *Checkerboard*. Os autores ressaltaram que, a despeito do pequeno número de amostras, não seria possível considerar, entre os métodos utilizados, o de superior detecção.

Socranski *et al.* (2004), em revisão da literatura, destacaram a utilização do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* na análise de ecossistemas complexos, como os encontrados na cavidade oral. A boa sensibilidade e especificidade do método foi ressaltada, e recursos que otimizam o uso das sondas de DNA na identificação que podem ser utilizados foram descritos.

Soriano de Souza *et al.* (2005), através do método *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, analisaram a microbiota de 12 casos de infecções endodônticas primárias assim como a utilização do hidróxido de cálcio como utilizado como medicação intracanal. Amostras dos canais radiculares foram coletadas após o acesso; instrumentados pela técnica *step-down*, em que brocas de Gattes-Glidden e limas manuais foram utilizadas; irrigados com solução de NaOCl 5,25%; e preenchidos com uma pasta de hidróxido de cálcio e solução salina, em uma consistência cremosa e

selados coronariamente com cimento temporário. Após 14 dias, o curativo foram removidos por irrigação com solução salina, e uma segunda coleta microbiológica dos canais radiculares procedida. Nas coletas após acesso aos canais radiculares, as espécies mais prevalentes foram *Fusobacterium nucleatum* sp. *vicentii*, *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga ochracea*, *Streptococcus constellatus*, *Veillonella parvula*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella melaninogenica* e *Streptococcus sanguis*. A maior parte dos microrganismos analisados foi reduzida após a terapia endodôntica. Esta redução microbiana após a terapia foi significativa estatisticamente. Os autores concluíram, entretanto, que o hidróxido de cálcio, por não ter sido capaz de eliminar todo o espectro microbiano, é limitado.

A detecção, em canais radiculares infectados, de filotipos ainda não cultivados e de espécies recentemente nomeadas, sugere que existem microrganismos previamente não reconhecidos que podem desempenhar papel na patogênese de doenças perirradiculares (Siqueira Jr. & Roças, 2005). Contudo, até o presente momento, não existe um único método que seja capaz de isolar todos os microrganismos presentes no sistema de canais radiculares (Vianna, 2006; Jacinto, 2006).

2.3. IMPORTÂNCIA DO PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO

Polpas necróticas são rapidamente invadidas e colonizadas por bactérias, pois a falta de circulação sangüínea compromete os mecanismos de defesa do hospedeiro. Os produtos da degradação pulpar e a possibilidade de estagnação e degradação de componentes proteicos dos fluidos tissulares servem como nutrientes essenciais à sobrevivência de microrganismos, que se estabelecem no sistema de canais radiculares, desencadeando reações de defesa do hospedeiro, caracterizada pelo desenvolvimento de lesão periapical. Portanto, as infecções endodônticas devem ser tratadas, principalmente, por procedimentos mecânicos auxiliados por substâncias químicas irrigadoras, capazes de remover as bactérias localizadas nos túbulos dentinários a uma pequena distância da superfície pulpar (Takahashi, 1998).

Yamashita (2000) destacou que o preparo químico-mecânico visa a limpeza dos canais radiculares, remoção de restos orgânicos e inorgânicos, neutralização do conteúdo séptico-tóxico, assim como a modelagem do canal radicular, proporcionando a sua dilatação e conformação cônica. Envolve uma associação dos meios mecânicos, físicos e químicos. O meio mecânico, representado pela ação dos instrumentos endodônticos nas paredes do canal radicular, promove a sua dilatação. Para a remoção dos restos orgânicos e inorgânicos produzidos, torna-se importante a atuação dos meios físicos (irrigação e aspiração) e químicos (soluções químicas-auxiliares).

Segundo Byström & Sundqvist (1981, 1983), a desinfecção de canais radiculares após o preparo químico-mecânico pode variar de 20% (sem o uso de irrigante antimicrobiano) a aproximadamente 80% (com o uso de um irrigante antimicrobiano).

Em 1985, Byström & Sundqvist concluíram que o preparo mecânico reduz consideravelmente o número de microrganismos e que a adição de uma solução irrigadora promove a desinfecção.

De Deus, já ressaltava, em 1985, que uma substância química auxiliar ideal para irrigação dos canais radiculares deve ter: capacidade antimicrobiana; ação de dissolução sobre tecido orgânico e mineral, remanescentes durante a instrumentação do sistema de canais; apresentar boa tolerância tecidual; ter ação residual efetiva; e aumentar a permeabilidade da dentina, para que possa penetrar no interior dos túbulos dentinários e ter uma ação direta sobre os microrganismos.

Sen *et al.* (1995), analisando dentes humanos recém-extraídos em microscopia eletrônica de varredura, observaram a presença acentuada de bactérias em forma de cocos e bastonetes, constituindo-se em colônias, principalmente nas paredes dos canais, e também, em grau variado, penetrando nos túbulos dentinários dos terços médio e apical das raízes, numa profundidade média de 50 μm . Em alguns espécimes chegando a atingir 150 μm . Siqueira Jr. *et al.* (1996) observaram que as bactérias anaeróbias também foram capazes de penetrar nos túbulos dentinários em diferentes profundidades, onde não podem ser atingidas por instrumentos endodônticos.

A eficiência da limpeza da região apical dos canais radiculares por diferentes técnicas de preparo tem sido investigada (Wu & Wesselink, 1995; Siqueira Jr. *et al.*, 1997).

Wu & Wesselink (1995), utilizando limas tipo K de aço inoxidável, compararam a eficiência de limpeza das técnicas *Step-Back*, Cérvico-apical e de Forças Balanceadas na região apical de canais curvos. Concluíram que, apesar da técnica avaliada, a porção apical dos canais foi menos limpa que os terços médio e cervical.

Siqueira Jr. *et al.* (1997) prepararam canais com a técnica *Step-Back*, utilizando limas de aço inoxidável ou de níquel- titânio, uma técnica ultrassônica utilizando lima ultrassônica tamanho 15, técnica de Forças Balanceadas utilizando limas *Flex-R* e instrumentos Canal Master U. Concluíram que nenhuma das cinco técnicas testadas foram efetivas no completo debridamento do sistema de canais radiculares.

Em 1997, Sjögren *et al.* avaliaram 55 uniradiculares, com periodontites apicais, submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única. Realizaram coletas após a instrumentação dos dentes, e preservaram os casos durante um período de 5 anos. Observaram que no momento da obturação, nos dentes com culturas negativas, a cicatrização completa ocorreu em 94% dos casos. Já naqueles com culturas positivas, a completa cicatrização ocorreu em apenas 68% dos casos. Houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos avaliados.

West & Roane (2000) registraram que a limpeza pode ser assegurada com a remoção mecânica do conteúdo do canal e da dissolução química, desintoxicação e remoção das substâncias inflamatórias e potencialmente inflamatórias. Concluíram, então, que existia um consenso sobre a importância da irrigação, mas o tipo apropriado de solução irrigadora ainda permanecia em discussão.

2.3.1. HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaOCl)

A preocupação com a descontaminação do sistema de canais radiculares tem sido evidente desde 1894, quando Callahan, propôs uma solução aquosa de ácido

sulfúrico 40%, que era neutralizada, a seguir, com uma solução de bicarbonato de sódio.

O NaOCl tem sido estudado e amplamente utilizado como solução irrigadora dos canais radiculares, em diferentes concentrações, desde que foi introduzido na Endodontia por Walker, em 1936.

Harrison, em 1984, em revisão de literatura sobre a irrigação do sistema de canais, analisou as propriedades do NaOCl 5,25%, e observou que, por apresentar boa capacidade antimicrobiana, dissolução de tecidos necróticos e matéria orgânica, este seria o irrigante endodôntico de escolha.

Entre as propriedades do NaOCl, destacam-se também ação desodorizante, clareadora, lubrificante, baixa tensão superficial, capacidade de promover saponificação de lipídeos (Grossman & Melman, 1941; Bloomfield & Miles, 1979), efetiva ação antimicrobiana (Gomes *et al.*, 2001; Ferraz *et al.*, 2001; Vianna *et al.*, 2004), e capacidade de dissolução de tecido orgânico (Senia *et al.*, 1971; Cunningham & Balekjian, 1980; Abou-rass & Oglesby, 1981; Naenni *et al.*, 2004).

Contudo, Yesilsoy *et al.* (1995) e Santa Cecília (1999), demonstraram que o NaOCl, em suas várias concentrações, apresenta algumas desvantagens, como a falta de capacidade de dissolução de material inorgânico e um potencial de irritação aos tecidos.

Embora o NaOCl seja um agente efetivo contra um amplo espectro de bactérias e dissolva tanto tecido vital quanto necrótico (Senia *et al.*, 1975), promove efeitos tóxicos aos tecidos vitais resultando em hemólise, ulceração e necrose (Pashley *et al.*, 1985). Com um pH de aproximadamente 11-12, causa injúria primariamente por oxidação de proteínas (Hülsmann & Hahn, 2000).

Acidentes com NaOCl resultam em dor severa, febre, rápido desenvolvimento de edema, hematoma, necrose, abscessos, comprometimento das vias respiratórias e deficiência neurológica. Relatos têm sido registrados na literatura, alertando sobre esses riscos, como: injeção nos tecidos periapicais (Sabala & Powell, 1989; Gatot *et al.*, 1991; Gernhardt *et al.*, 2004); injeção no seio maxilar (Enrich *et al.*, 1993); reação

tóxica à substância causada pelo efeito oxidativo nos tecidos vitais da região periapical (Becking, 1991); queimadura por vazamento através do isolamento absoluto (Serper *et al.*, 2004); edema e equimose tecidual e dano ao nervo infra-orbitário por extravazamento através de ápice radicular reabsorvido por lesão periapical (Witton & Brennan, 2005); necrose da mucosa de palato (Gursoy *et al.*, 2006) e necrose gengival e óssea (Pontes *et al.*, 2008) por injeção de NaOCl ao invés do anestésico.

Baumgartner & Mader (1987) avaliaram em microscopia eletrônica de varredura (MEV) a capacidade de limpeza dos canais com quatro métodos de irrigação, tanto em superfícies instrumentadas quanto naquelas não instrumentadas. Quando se utilizou a solução salina e o NaOCl 5,25%, formou-se uma típica camada residual nas paredes instrumentadas. O uso isolado do NaOCl antes ou após a instrumentação endodôntica teve ação apenas sobre a camada mais superficial da *smear layer*, promovendo remoção de restos pulpare e de pré-dentina. Enquanto que, no grupo irrigado com EDTA, houve a remoção predominantemente da matriz inorgânica. A combinação de NaOCl 5,25% e do EDTA 17% propiciou a remoção da *smear layer* das paredes instrumentadas e naquelas não instrumentadas expôs as calcosferitas, mostrando superfícies adequadamente limpas.

Baumgartner & Cuenin (1992) investigaram através de MEV, superfícies radiculares instrumentadas e irrigadas pelo tempo de 12 minutos por diferentes concentrações de NaOCl 0,5; 1,0; 2,5 e 5,25%, notaram que, as concentrações a 1,0; 2,5 e 5,25% foram mais efetivas, removendo os remanescentes pulpare e pré-dentina de superfícies não instrumentadas, enquanto que a solução a 0,5% deixou algumas fibrilas na superfície.

Garberoglio & Becce, em 1994, afirmaram que em canais infectados, a dentina compactada no interior dos túbulos dentinários e canais acessórios, denominada de *smear plug*, produzida durante a instrumentação, também deve ser removida para facilitar o efeito antibacteriano da medicação intracanal. O material utilizado para este fim deve ser biocompatível com os tecidos periapicais e promover apenas limitada desmineralização da dentina e dos túbulos dentinários.

Ayhan *et al.*, em 1999, pesquisaram os efeitos antimicrobianos de vários irrigantes endodônticos sobre microrganismos selecionados. O NaOCl 5,35%, quando comparado ao álcool 21%, ao NaOCl 0,5% e à clorexidina 2%, foi o que apresentou os melhores resultados antimicrobianos; e que a redução da concentração do NaOCl 5,25% para 0,5% diminuiu significativamente o poder antimicrobiano da solução.

Jeansonne & White (1994) compararam a ação bactericida da clorexidina a 2% e do NaOCl a 5,25% e perceberam que ambos possuíam comportamento semelhantes, porém, relataram a importância da propriedade de dissolução de tecido pulpar conferido apenas ao NaOCl.

2.3.2. CLOREXIDINA

A clorexidina é uma molécula catiônica simétrica, composta por dois anéis simétricos 4-clorofenil e dois grupos bisguanida conectados por um anel central de hexametileno. A forma mais estável de preparação é com o sal de digluconato por ser altamente solúvel em água, e quando em pH fisiológico dissocia-se facilmente, liberando componentes carregados positivamente da clorexidina. O mecanismo de ação da clorexidina é mediado por diversos fatores. Suas moléculas com carga positiva são atraídas pela carga eletrostática negativa da bactéria. Isso promove a adsorção da clorexidina na superfície bacteriana. A ligação ocorre na membrana citoplasmática e causa a perda do equilíbrio osmótico, ocorrendo a extrusão da membrana, formação de vesículas e precipitação do citoplasma, o que inibe o reparo da parede celular, resultando na perda do material intracelular (Rölla & Melsen, 1975).

A literatura tem registrado como suas propriedades de ação: antimicrobiana imediata, amplo espectro antibacteriano sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, anaeróbias, facultativas e aeróbias, leveduras e fungos (Hennessey, 1973; Greenstein *et al.*, 1986; Fardal & Turnbull, 1986; Vianna *et al.*, 2004; Dametto *et al.*, 2005); especificamente frente à *Candida albicans* (Waltimo *et al.*, 1999); relativa ausência de toxicidade (Greenstein *et al.*, 1986); capacidade de adsorção pela dentina

e lenta liberação da substância ativa, o que prolonga sua substantividade residual (Heling *et al.*, 1992; Jeansonne & White, 1994; White *et al.*, 1997). É menos efetiva contra esporos, fungos e protozoários (Rutala & Weber, 1997) e não dissolve tecidos orgânicos (Abou-Rass & Piccinino, 1982; Jeansonne & White, 1994).

Delany *et al.*, em 1982, avaliaram, *in vitro*, a capacidade antimicrobiana da solução de clorexidina 0,2%. Utilizaram 40 dentes com polpa necrótica recém extraídos. O preparo químico-mecânico empregou a solução de clorexidina ou solução salina. A eficiência da clorexidina na redução do número de bactérias remanescentes foi observada após a realização de culturas microbiológicas, em até 24 horas. Os autores sugeriram então a utilização da clorexidina como solução irrigadora e como curativo de demora.

Jeansonne e White, em 1994, compararam, *in vitro*, a atividade antibacteriana do digluconato de clorexidina 2% e do NaOCl 5,25%, e observaram uma redução significativa do número de unidades formadoras de colônias, sem diferença significativa entre os grupos testados. Os autores sugeriram a utilização de clorexidina em pacientes alérgicos ao NaOCl e nos casos de grande risco de contato do irrigante com os tecidos periapicais, devido a sua boa capacidade antimicrobiana e por ser inócuo a esses tecidos. Contudo, ressaltaram que, a ausência da toxicidade da clorexidina não basta nos casos em que há necessidade de dissolução tecidual e ação clareadora, sendo indicado nesses casos o uso do NaOCl, por apresentar estas propriedades.

Gomes *et al.*, (2001) avaliaram, *in vitro*, através da metodologia de contato direto (difusão em caldo), a susceptibilidade do *Enterococcus faecalis* a diversas concentrações de NaOCl (0,5%; 1%; 2,5%; 4% e 5,25%) e 2 formas de gluconato de clorexidina (gel e líquida) em 3 concentrações (0,2%; 1% e 2%). As substâncias foram testadas por períodos de 10, 30 e 45 s; 1, 3, 5, 10, 20 e 30 min; e 1 e 2 horas. Todos os irrigantes testados foram efetivos contra o *Enterococcus faecalis* em diferentes períodos de tempo. A clorexidina líquida, em todas as concentrações testadas, e o NaOCl 5,25% foram os mais eficientes, eliminando os microorganismos em 30 s. A clorexidina gel 2% também demonstrou um bom desempenho, eliminando os microorganismos em apenas 1 min.

Önçag *et al.*, (2003) compararam, *in vitro*, a propriedade antimicrobiana e a toxicidade do NaOCl 5,25%, gluconato de clorexidina 2% e gluconato de clorexidina 0,2% adicionado a cetrimida 0,2% (Cetrexidín®) utilizados como irrigantes após 5 min e 48 h em dentes humanos recém extraídos, que haviam sido infectados com *Enterococcus faecalis*. Os efeitos tóxicos foram testados pela injeção dos irrigantes testados em tecido subcutâneo de ratos. As reações inflamatórias que ocorreram após 2 h, 48 h e 2 semanas foram avaliadas. Concluíram que o Cetrexidín® e o gluconato de clorexidina 2% foram mais efetivos, com menor toxicidade que o NaOCl 5,25%.

Sassone *et al.* (2003b) avaliaram, *in vitro*, o crescimento bacteriano (ATCC – *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*) após contacto por diferentes tempos (imediatamente, 5 min, com NaOCl (1% e 5%) e clorexidina (CHX - 0,12% e 0,5% e 1%). Para simular o tecido orgânico presente no sistema de canais radiculares, em metade das amostras foi adicionada albumina sérica bovina (BSA). A solução de CHX 0,12% não eliminou o *Enterococcus faecalis* em nenhum dos tempos testados. A solução de CHX 1% eliminou todos os microrganismos, assim como o NaOCl o fez em todas as concentrações testadas. foi efetiva em todos os tempos. A BSA não interferiu substancialmente com a atividade antimicrobiana de nenhuma das soluções. Os autores concluíram que a solução de CHX 0,12% foi inefetiva na eliminação do *Enterococcus faecalis*.

Sassone *et al.* (2003a) concluíram que soluções de clorexidina têm que ser usadas em uma concentração maior que 0,12% para obter um espectro antimicrobiano mais amplo e devem ser usadas quando o contato entre a solução irrigante e a região periapical for inevitável, tal como frente a ápice aberto, perfuração ou cirurgia pararendodôntica. Também deveria ser usada em casos de alergia ao NaOCl e como um medicamento entre sessões, tirando vantagem de sua ação de substantividade.

Em 2004, Vianna *et al.* investigaram, *in vitro*, a atividade antibacteriana do gluconato de clorexidina 0,2; 1 e 2%, tanto sob a forma gel quanto sob a forma líquida, contra os patógenos endodônticos, e compararam os resultados com aqueles encontrados para o NaOCl 0,5; 1,0; 2,5; 4 e 5,25%. Foi utilizado um teste de diluição

em meio (*broth dilution test*) e os tempos necessários para os irrigantes eliminarem as células microbianas foram registrados e analisados estatisticamente. Os autores observaram que a clorexidina 2%, tanto sob a forma gel quanto líquida, eliminou *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* em 15 s. Para eliminar o *Enterococcus faecalis* a clorexidina gel 2% precisou de 1 min. Todos os irrigantes testados eliminaram *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* em 15 s. O tempo requerido pela clorexidina líquida 1 e 2% para eliminar todos os microorganismos foi o mesmo requerido pelo NaOCl 5,25%. Concluíram, então, que a ação antimicrobiana está relacionada ao tipo, concentração e forma de apresentação dos irrigantes, bem como à susceptibilidade microbiana.

Em 2007, Wang *et al.* avaliaram a eficácia clínica da clorexidina gel 2% na redução bacteriana durante a instrumentação, e seu efeito antibacteriano adicional quando utilizada como medicação intracanal em associação ao Ca(OH)_2 , por 2 semanas. Foram estudados 39 dentes com periodontites apicais que apresentavam culturas positivas imediatamente após o acesso endodôntico. Os dentes foram preparados com a utilização de instrumentos rotatórios e clorexidina gel 2% como desinfetante. Após a instrumentação, os canais foram irrigados com 2 mL de um agente neutralizante para a clorexidina, por 5 min. Posteriormente foram irrigados com solução salina para a coleta microbiológica. Depois de realizada a coleta, os canais radiculares foram preenchidos com uma pasta de Ca(OH)_2 + clorexidina gel 2%, que permaneceu nos dentes por um período de 2 semanas. Após este período, foram realizadas novas coletas previamente à obturação dos dentes. Os resultados mostraram que das culturas positivas que os 39 dentes apresentavam inicialmente, 10,3% continuavam positivas após a instrumentação com clorexidina gel 2%, e 8,3% após o período de 2 semanas de utilização da medicação intracanal de Ca(OH)_2 + clorexidina gel 2%. Desta forma, os autores concluíram que a clorexidina gel 2% é um efetivo desinfetante intracanal, e sua utilização como medicação intracanal associada ao Ca(OH)_2 não melhorou significativamente a redução bacteriana nos canais radiculares estudados.

Siqueira Jr. *et al.* (2007) acessaram, *in vivo*, a redução bacteriana após preparo químico-mecânico com solução de diglonato de clorexidina (CHX) 0,12% e efeito

antibacteriano aditivo de medicação intracanal com hidróxido de cálcio associado a gel de clorexidina 0,12%. Treze dentes com infecção intrarradicular primária e periodontite apical foram selecionados para o estudo. Amostras foram coletadas dos canais no início do experimento (S1), após o preparo químico-mecânico com CHX 0,12% (S2) e depois de 7 dias de curativo com pasta de $\text{Ca(OH)}_2/\text{CHX}$ (S3). As bactérias coletadas dos canais radiculares foram cultivadas, contadas e identificadas pela análise sequencial do 16s rRNA-PCR. Uma alta significante na redução da contagem bacteriana foi observada entre S1 e S2 e entre S1 e S3 ($p < 0,001$). Diferenças significantes também foram observadas tanto em relação à quantidade de redução de bactérias ($p = 0,014$) e número de casos com culturas negativas ($p = 0,01$). Os autores concluíram que o preparo químico-mecânico com uso de solução de CHX 0,12% como irrigante reduziu significativamente o número de bactérias intra-canal, mas não foi capaz de deixar o canal livre de bactérias em quase metade dos casos. A aplicação de uma medicação intracanal com uma pasta de $\text{Ca(OH)}_2/\text{CHX}$ aumentou significativamente o número de casos com cultura negativa.

2.4. IMPORTÂNCIA DO MODELO ANIMAL CÃO NA ENDODONTIA

Em muitas situações de experimentação, principalmente quando se propõe uma nova terapêutica, resultados contrários aos que seriam o objetivo daquele experimento podem ocorrer, promovendo danos indesejáveis. Mormente na pesquisa com drogas ou fármacos, na área cirúrgica e de novos equipamentos, a experimentação em humanos precisa ser precedida de provas laboratoriais e da experimentação em animais. Experimentar tratamentos novos em animais serve, então, não apenas para adestrar o pesquisador e aperfeiçoar a técnica, mas também para avaliar os riscos envolvidos na experimentação (Vieira & Hossne, 1998).

Portanto, embora as evidências mais valiosas sejam aquelas obtidas de experimentos em humanos, estes não podem ser considerados como métodos de acesso biológico rotineiros, e testes *in vivo* devem ser conduzidos em animais (Rowe, 1980).

Weaver *et al.*, em 1962, listaram aqueles que seriam os atributos desejados em um animal de experimento: um padrão de crescimento similar ao homem; uma relação de crescimento adequada para estudos analíticos ou experimentais que seja rápida o suficiente para permitir resultados em períodos razoáveis de tempo, e ainda assim permitir diferenciação de passos sucessivos, e a aplicação de variáveis controladas a níveis de crescimento críticos; fisiologicamente similar ao homem, incluindo mastigação, movimentos mandibulares, adaptabilidade a mudanças de ambiente, solidez e resistência a infecções endêmicas; tamanho dos dentes e arcadas adequados para permitir intervenções cirúrgicas ou dentais, e medidas de crescimento com margem de erro experimental relativamente pequena; acesso aos dentes e glândulas orais para procedimentos clínicos; e baixo custo de aquisição e manutenção.

Pode-se discutir que as conclusões tiradas de experimentos em animais não possam ser diretamente relacionadas para o tratamento em dentes humanos, todavia, uma comparação dos efeitos de vários materiais em tecidos animais nos dará uma indicação do provável efeito em humanos (Rowe, 1967).

Vários tipos de animais de laboratório têm sido usados ao longo da história da pesquisa odontológica. Para o estudo da cárie, ratos, hamsters e macacos têm sido utilizados, enquanto que para o estudo da doença periodontal, além destes, incluem-se cães, gatos e ovelhas (Levy, 1980).

A escolha do modelo depende de aspectos inerentes ao animal, que sejam apropriados ao objetivo da pesquisa. Assim, em Endodontia, quando o estudo é conduzido em dentes e estruturas adjacentes, macacos, cães, gatos, porcos em “miniatura” e ratos têm sido usados, mas todos apresentam problemas (Rowe, 1980).

Diferentes espécies de macacos têm sido utilizadas como modelo experimental em odontologia: *Macaca mulatta* (Vidair & Butcher, 1955; Sinai *et al.*, 1967); *Macaca irus* (Torneck & Smith, 1970); *Macaca fascicularis* (Fabricius *et al.*, 1982; Fabricius *et al.*, 2006; Bergenholtz *et al.*, 2006); *Cebus apella* (Assunção, 1992; Araújo-Filho, 2001). Como modelo experimental apresentam muitas vantagens, sendo sua íntima relação com o homem a mais importante delas. Principalmente os de pequeno porte têm sido utilizados, porém são animais de alto custo, difíceis de serem criados e domesticados

(Berbert, 1999). Não são ideais para tratamento endodôntico, pois são difíceis de anestésias por longos períodos de procedimento, seus dentes são pequenos, com canais estreitos, e os dentes anteriores possuem raízes curvas (Sinai *et al.*, 1967; Torneck & Smith, 1970; Koenigs *et al.*, 1975). Além disto, possuem resistência distintamente superior à do homem, sendo seu tecido pulpar altamente resistente aos efeitos da contaminação bucal (Torneck *et al.*, 1973).

Gatos apresentam problemas de anestesia similares aqueles dos macacos de pequeno porte, além disto, o tamanho e a morfologia de seus dentes, com exceção dos caninos, em muito limita a viabilidade de sua utilização, já que em cada animal somente quatro dentes podem ser utilizados (Rowe, 1967).

O desenvolvimento embriológico do porco tem sido há muito reconhecido como bem similar ao do homem. Por esta similaridade e disponibilidade, embriões de porcos têm sido usados para estudos comparativos e até mesmo para complementação de série embriológica em livros textos de embriologia humana. Para controlar o crescimento deste animal, que por razões comerciais é rápido e de grande porte, foi desenvolvido laboratorialmente o porco em “miniatura”, com finalidade de emprego em programas de pesquisas laboratoriais (Weaver *et al.*, 1962). Este modelo animal é provavelmente adequado para pesquisa no campo da odontologia, possuindo dentição decídua e permanente, movimentos mandibulares de mordida e trituração, porém, poucos registros de sua utilização são encontrados na literatura (Su, 1992; Xu *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 2002).

Yankell (1985) afirmou que ratos são os animais mais freqüentemente usados em experimentos odontológicos. Esse modelo animal foi utilizado em estudos que analisaram resposta tecidual em subcutâneo (Torneck, 1966; Torneck, 1967; Gomes Filho *et al.*, 2001; Holland *et al.*, 2002), assim como em osso alveolar (Okamoto, 1964; Lin *et al.*, 1994; Cintra *et al.*, 2006). O estudo que indicou ser de fato a cárie uma doença bacteriana transmissível, foi conduzido em ratos *germ-free* (Fitzgerald, 1968). O papel desempenhado pelas bactérias e seus produtos na indução das infecções pulpares e perirradiculares foi esclarecido em estudo em que este modelo, “germ-free” e convencional, foi utilizado (Takehashi *et al.*, 1965). Embora a espessura de esmalte

na superfície oclusal dos molares de rato seja menor, existe similaridade de forma com os molares humanos. A raiz mesial do primeiro molar de rato tem sido usada, porém, embora estes animais tenham a vantagem de baixo custo, com criação simples, o procedimento operatório é difícil (Rowe, 1980).

Hamsters são outro modelo utilizado (Keyes *et al.*, 1962; Jordan & Keyes, 1964), tendo vantagens similares às dos ratos, além de ter abertura de boca maior que estes. Sua maior desvantagem, principalmente nas pesquisas de fissuras e cáries, é não possuírem anatomia oclusal extensiva em seus molares (Yankell, 1985).

Fouad *et al.*, em 1992, na Universidade de Iowa, nos EUA, utilizaram caninos de furões (*Mustela putorius furo* L.) em avaliação radiográfica e histológica de lesões periapicais induzidas. Ressaltaram a vantagem do baixo custo deste modelo animal, tanto para compra quanto para manutenção; o que propicia aos pesquisadores o uso de maior número de animais, quando comparados aos gatos, cães ou macacos. Por serem passíveis de criação específica para pesquisa, grande número de furões standardizados podem estar disponibilizados.

O cão é um mamífero onívoro e biologicamente similar ao homem, como demonstrado pelo caráter de reações inflamatórias em secções histológicas (Hill, 1932; Dixon & Rickert, 1938). Há concordância corrente de que o cão seja um excelente animal de experimento. Cães são relativamente pequenos, de fácil manuseio e extremamente cooperativos durante a experimentação. Seus tecidos orais, especialmente a junção dento-gengival, o periodonto, e o tamanho de seus dentes são bem similares aos do homem, embora existam diferenças anatômicas, topográficas e fisiológicas evidentes (Page & Schoroeder, 1982). São animais de fácil obtenção e manutenção, portanto economicamente viáveis.

A literatura registra vários trabalhos com a utilização do modelo animal cão, machos ou fêmeas, de diferentes espécies, incluindo: beagles (Rowe & Binnie, 1977; Isermann & Kaminski, 1979; Pitt Ford, 1984; Kolberg, 1992; Friedman *et al.*, 1997, 2000; Ottoboni Filho, 2000), perdigueiros alemães (Page & Schroeder, 1982), collies (Orbán, 1933; Synder *et al.*, 1966; Shoji *et al.*, 1985), labradores (Salman *et al.*, 1999), settler irlandês (Kolberg, 1992; Nieves *et al.*, 1997), e de raça indefinida (Bhaskar &

Rappaport, 1971; Davis *et al.*, 1971; Valdrighi, 1976; West *et al.*, 1979; Holland *et al.*, 1979b; Shoji *et al.*, 1985; Takahashi, 1985; Allard *et al.*, 1987; Souza Filho *et al.*, 1987; Soares *et al.*, 1990a,b; Leonardo, 1992; Gadê Neto, 2000; Ferreira *et al.*, 2001; Berbert *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2002a; Rabang *et al.*, 2002; Gadê Neto *et al.*, 2003; Ferreira, 2003; Holland *et al.*, 2003; Rabang, 2003; Gadê Neto, 2004; Holland *et al.*, 2005; Holland *et al.*, 2007a,b).

Os autores têm encontrado estreita similaridade nos processos de reparo dos dentes e estruturas de suporte entre humanos e cães em diversas situações clínicas (Citrome *et al.*, 1979).

Na Periodontia, o modelo animal cão tem sido utilizado para estudo da etiologia e evolução da doença periodontal (Jansen & Pilot, 1981; Jansen, 1982; Groisman & Klinge, 1990). A microbiota oral e das doenças periodontais em dentes de cães tem também sido investigada (Saphir & Carter, 1976; Kornman *et al.*, 1981; Laliberté & Mayrand, 1983; Goldstein *et al.*, 1984; Brook, 1989; Allaker *et al.*, 1992; Renvert *et al.*, 1996; Allaker *et al.*, 1997a, b; Nieves *et al.*, 1997; Gadê-Neto, 2000; Stepanovic, 2001).

Para avaliação da resposta do tecido pulpar, Orbán, em 1933, investigou a ação do paraformaldeído, usando cães. Block *et al.*, em 1979, avaliaram a antigenicidade de tecido pulpar de cães experimentais, antes e após incubação com cimento AH-26. Shoji *et al.*, em 1985, conduziram estudo dos efeitos da irradiação do laser de CO₂ na polpa dental de cães de raça indefinida, num relato preliminar sobre o laser na pulpotomia.

Vários estudos avaliaram a resposta dos tecidos periapicais de cães frente a diferentes protocolos de tratamento, materiais obturadores e técnicas de obturação endodôntica. Snyder *et al.*, em 1966, utilizando collies, avaliaram os efeitos do cimento N₂. Strömberg, em 1969, num estudo comparativo entre diferentes materiais obturadores, observou o reparo periapical após pulpectomia total em cães. Davis *et al.*, em 1971, estudaram o reparo periapical e intra-canal em cães de raça indefinida, com canais radiculares incompletamente obturados. Holland, em 1975, avaliou o reparo do coto pulpar e dos tecidos periapicais de cães de raça indefinida, após biopulpectomia e obturação de canal com duas diferentes substâncias. Valdrighi, em 1976, avaliou radiográfica e histopatologicamente, em cães de raça indefinida, a influência dos

“espaços vazios” nos resultados dos tratamentos de canais radiculares. West *et al.*, em 1979, também utilizando cães de raça indefinida, conduziram estudo piloto em cães, sugerindo o recobrimento de cones de prata com Teflon de carga negativa. Soares *et al.* (1990a) avaliaram a influência do cimento obturador no comportamento dos tecidos periapicais de dentes de oito cães, após o tratamento endodôntico em uma ou em duas sessões. Em outro estudo, Soares *et al.* (1990b) utilizaram 120 raízes de dentes de cães para observar a resposta dos tecidos periapicais a cimentos endodônticos contendo hidróxido de cálcio. Holland *et al.* (2003) observaram histomorfologicamente o processo de reparo, em 60 raízes de dentes de cães com lesão periapical induzida, após tratamento endodôntico em uma ou duas sessões, em que o hidróxido de cálcio foi utilizado como medicação intra-canal. Utilizando diferentes técnicas operatórias, Leonardo *et al.* (1994) avaliaram radiograficamente e bacteriologicamente reparo apical e periapical em dentes de cães com lesão periapical crônica induzida, após tratamento endodôntico com diferentes protocolos. Holland *et al.* (2007a) investigaram a influência do tipo de veículo, na resposta dos tecidos apicais de dentes de cães, após obturação de canais radiculares com agregado trióxido mineral.

A resposta dos tecidos periapicais também foi avaliada por Benatti *et al.*, em 1985, em cães de raça indefinida, após o efeito do alargamento foraminal da porção apical do canal radicular. Em 1987, Souza Filho *et al.*, avaliaram a influência do alargamento do forame apical no reparo de dentes contaminados de cães. Ainda Souza Filho *et al.*, em 1996, avaliaram a influência do nível da obturação e do alargamento do forame apical no processo de reparo tecidual, em cães de raça indefinida. Em 2005, Holland *et al.*, analisaram o processo de reparo em dentes de cães com polpa vital, instrumentados com ou sem patência apical e obturados com dois diferentes tipos de cimentos endodônticos.

Utilizando cães labradores, Salman *et al.*, em 1999, conduziram avaliação de reparo após perfuração de furca com a utilização de membrana reabsorvível abaixo de ionômero de vidro resinoso modificado. Rodrigues (2000), também avaliou, radiograficamente, reparo de lesões de furca após diferentes procedimentos de descontaminação e selamento coronário em cães de raça indefinida. Holland *et al.* (2007b) avaliaram, em dentes de cães de raça indefinida, o processo de reparo tecidual

em perfurações laterais não-contaminadas e contaminadas, seladas com agregado trióxido mineral, assim como os efeitos da utilização de um agente bactericida nas perfurações contaminadas, antes do selamento.

No campo da cirurgia parendodôntica, o modelo animal cão foi utilizado por Bernabé, em 1994, que avaliou histopatologicamente dentes com lesão periapical, após apicetomia e tratamento endodôntico via retrógrada, observando a influência do nível da obturação e do material obturador. Em 2003, Bernabé *et al.*, analisaram o comportamento dos tecidos periapicais de cães, com lesões periapicais, submetidos a obturação retrógrada convencional com auxílio do ultra-som empregando ou não o microscópio clínico odontológico.

O modelo cão também tem sido utilizado para o estudo de microinfiltração coronária. Friedman *et al.*, em 1997, investigaram a penetração de bactérias intraorais, e a eficácia de cimentos endodônticos na prevenção de inflamação perirradicular, em dentes de beagles endodonticamente tratados. Para tal estudo, inocularam placa dental nas câmaras pulpaes após duas semanas de preenchimento dos canais com material obturador. Friedman *et al.*, em 2000, avaliaram resistência à infiltração bacteriana coronária, de um cimento obturador endodôntico experimental de ionômero de vidro, utilizando cães beagle. Gadê Neto *et al.* em 2003, avaliaram a microinfiltração coronária, *in vivo*, utilizando dois materiais seladores provisórios e um definitivo, em pré-molares de cão de raça indefinida. Em 2004, Gadê Neto, avaliou a influência do selamento coronária na obturação endodôntica em dentes de cães de raça indefinida, afirmando ter optado pelo modelo animal para tornar seus resultados mais próximos à realidade clínica.

Outro aspecto importante no modelo animal cão diz respeito ao seu tempo de crescimento e desenvolvimento, que é bastante adequado para estudos analíticos ou experimentais, pois é rápido o suficiente para permitir resultados em períodos razoáveis de tempo. Labeau, em 1953, apresentou uma forma para cálculo da relação entre a idade do cão e do homem, multiplicando o número de meses ou anos de vida do cão por um coeficiente único e fixo, obtendo, assim, a equivalência etária nos humanos. De acordo com o referido autor, 6 meses de idade no cão corresponde a 10

anos no homem, enquanto que 4 anos no cão são 32 anos no homem. Desta forma, a época da puberdade do cão se situa entre os 7 e 13 meses. Um cão de 16 anos apresenta idade relativa a um homem de 80 anos.

Orbán, em 1932, bem sumarizou porque os cães são modelos ideais, quando afirmou que os dentes dos cães são mais sensíveis que os dos humanos, a qualquer tipo de injúria. Fazendo correlação deste fato com a maior permeabilidade da dentina e cemento no cão que nos humanos, conjecturou que, se o tratamento no muito mais sensível cão se prova satisfatório, o mesmo tipo de resultado pode ser esperado em humanos.

2.4.1. ASPECTOS ANATÔMICOS E FUNCIONAIS DA DENTIÇÃO DO CÃO

Os cães possuem uma dentição decídua e outra permanente. A decídua é composta de 3 incisivos superiores (I^1 , I^2 , I^3), 3 incisivos inferiores (I_1 , I_2 , I_3), 1 canino superior (C^1), 1 canino inferior (C_1), 3 molares superiores (M^1 , M^2 , M^3) e 3 molares inferiores (M_1 , M_2 , M_3). Na dentição permanente encontram-se 3 incisivos superiores (I^1 , I^2 , I^3), 3 incisivos inferiores (I_1 , I_2 , I_3), 1 canino superior (C^1), 1 canino inferior (C_1), 4 pré-molares superiores (P^1 , P^2 , P^3 , P^4), 4 pré-molares inferiores (P_1 , P_2 , P_3 , P_4), 2 molares superiores (M^1 , M^2) e 3 molares inferiores (M_1 , M_2 , M_3) (Shabestari *et al.*, 1967).

Os dentes decíduos iniciam sua erupção por volta de três semanas após o nascimento, que se completa pelo final da quinta semana, na seqüência de caninos, incisivos e molares. A esfoliação destes temporários inicia-se por volta dos 110 dias de idade. Os primeiros pré-molares, primeiros dentes permanentes a aparecer, erupcionam sem a presença de um precursor decíduo, por volta dos 106 dias na maxila e 130 dias na mandíbula. Seguem-se os incisivos, os primeiros molares, os caninos e os pré-molares restantes. Os segundos e terceiros molares, últimos permanentes a aparecer, erupcionam por volta dos 150 e 175 dias, respectivamente. Portanto, ao final dos 6 meses, a dentição permanente está completa e pronta para função (Shabestari *et al.*, 1967).

Os segundos, terceiros e quartos pré-molares inferiores são recomendados para pesquisa em capeamento pulpar e procedimentos endodônticos. O segundo pré-molar é usualmente unirradicular, mas pode, ocasionalmente, ser similar aos segundos e terceiros pré-molares, que possuem uma raiz mesial e outra distal, com canais amplos o suficiente para permitir instrumentação da região apical com equipamento convencional. As coroas possuem forma de lâmina e a câmara pulpar evolui de um corno central proeminente para um pequeno corno mesial e outro distal, antes de adentrar aos canais radiculares (Barker & Lockett, 1971).

A cavidade pulpar é muito mais ampla e a dentina mais delgada em cães em crescimento; no entanto, quando o cão está completamente maduro, a dentina ganha espessura, de modo que a cavidade pulpar de um cão adulto tem aproximadamente um quarto do diâmetro do dente (Lawson *et al.*, 1967).

Pela frequência com que o cão tem sido utilizado nas investigações de reações periapicais e estudos de toxicidade de diferentes tipos de medicações endodônticas, Masson *et al.* (1992) conduziram estudo da anatomia do ápice radicular em 240 dentes permanentes de oito diferentes cães, com distintas faixas etárias. Observaram que um canal único principal estava sempre presente em cada raiz, mesmo nos dentes multirradiculados, e que havia uma redução no volume da polpa radicular com o aumento da idade, ratificando os achados de Harvey *et al.* (1985). Um forame apical único não foi observado. Em cada um dos dentes observou-se que, a alguns milímetros do término da raiz, o canal dividia-se em numerosas pequenas ramificações, irradiando-se perifericamente através da dentina e do cimento e terminando em diversas foraminas na superfície externa do cimento. A existência deste complexo delta apical, em todos os dentes de cães estudados, foi confirmada por microscopia eletrônica de varredura. Estes achados confirmaram os de Takahashi *et al.* (1982), Takahashi (1985), e Roush *et al.* (1989), em seus estudos prévios a respeito da arquitetura vascular apical em dentes de cão. Baltieri *et al.* (2002), estudando a anatomia interna de 42 dentes de cães de raça indefinida, através do método de diafanização, encontraram deltas apicais em 78,2% dos dentes estudados, enquanto canais laterais foram encontrados em 7,2% dos casos, principalmente nos terços

cervical e médio. A porcentagem de canais laterais encontrada em pré-molares e molares foi de 12,5% e 10%, respectivamente.

Em dentes humanos esta complexidade não é observada, porém, De Deus (1975) relatou que as foraminas que formam o delta ou deltas, são as ramificações mais comumente encontradas nas raízes dentárias (37,2% em média geral dos dentes), sendo mais frequentes nos molares e pré-molares superiores. Segundo Hess & Keller (1988) as ramificações apicais estão presentes, em média, em 42 % dos casos, e o canal principal com frequência possui um trajeto tortuoso em sua terminação. A impossibilidade de limpeza mecânica desta região é aceita, pois a limpeza e a dilatação proporcionadas pelo preparo químico-mecânico atingem apenas o canal principal (Panzarini, 1996).

O número de foraminas em dentes de cães é maior que em humanos, e as ramificações na câmara pulpar ocorrem com maior frequência do que no dente humano. Estas características anatômicas devem contar pelo fato de que granulomas dentários são mais rapidamente produzidos em cães do que em seres humanos (Hill, 1932).

Portanto, a marcada complexidade do ápice radicular do cão é considerada como um fator morfológico vantajoso quando se está empenhado em erradicar bactérias desta região. O ápice dental do cão, quando infectado, proporciona um rigoroso teste para métodos de eliminação de bactérias nesta região (Barker & Lockett, 1971).

2.4.2. MÉTODOS DE INDUÇÃO DE LESÃO PERIAPICAL NO MODELO ANIMAL CÃO

A literatura descreve diferentes métodos que promovem a infecção intraradicular, induzindo lesão periapical em dentes de cães. No Brasil, Holland & Zerlotti (1965) foram pioneiros nesta metodologia de pesquisa.

Matsumiya & Kitamura, em 1960, promoveram a exposição dos canais radiculares de 17 cães e os deixaram abertos, expostos ao meio oral por 20-83 dias,

para promover situação em que haveria infecção natural. Estes autores relataram ter comprovado, radiograficamente, que quase todos estes espécimes infectados apresentaram um processo inflamatório em sua região apical. Outros autores têm utilizado este método de indução de lesão periapical, com variações de período de exposição: Souza Filho *et al.* (1987), 45 dias; Holland *et al.* (1979a), 2 a 3 meses; Esberard (1992), 90 dias; Snyder *et al.* (1966), 4 meses; Holland *et al.* (1992), Panzarini (1996), Rabang (2003a, b), Otoboni Filho, 2000 e Holland *et al.* (2003), 6 meses. Todos observando radiograficamente, presença da área radiolúcida junto ao ápice dos dentes estudados.

Em um segundo método relatado na literatura, os canais permanecem expostos para contaminação ao meio oral por apenas 5-7 dias, sendo depois então selados. Após o período de 30 dias, controles radiográficos quinzenais são procedidos. Em geral, após 45 dias as imagens radiolúcidas sugestivas de reação periapical são constatadas, radiograficamente, (Leonardo *et al.*, 1994; Leonardo *et al.*, 1995; Tanomaru Filho, 1996; Silveira, 1997; Berbert, 1999; De Rossi *et al.*, 2005).

Em dentes de cães com ápices incompletamente formados, Leonardo *et al.*, (1993) utilizaram método em que o tecido pulpar foi cuidadosamente removido, e os canais permaneceram expostos ao meio oral por 5 dias para contaminação. Após este período, as cavidades foram seladas com óxido de zinco por período que variou entre 10 a 15 dias, tempo que se mostrou suficiente para a formação de lesões periapicais.

Um terceiro método é descrito, em que se realiza o arrombamento do forame apical, após o acesso e remoção da polpa radicular, permanecendo os canais expostos por 7 dias ao meio bucal, quando se promove o selamento da câmara pulpar. Controles radiográficos quinzenais são efetuados e, normalmente após 45 dias, observam-se imagens radiolúcidas sugestivas de reação periapical (Soares, 1999). Ferreira (2003) ressaltou que este procedimento tem por intenção obter uma condição mais próxima do canal cementário humano.

Outra variação de metodologia para indução de lesão periapical no modelo animal cão descrita é a em que, após a remoção da polpa radicular, os canais são inoculados com cultura de *Streptococcus*, hemolíticos ou não hemolíticos, (Hill, 1932),

e após 2-3 meses a reação periapical pode ser detectada radiograficamente (Barker & Lockett, 1971). McCormick *et al.*, em 1983, inoculando *Streptococcus* gama hemolíticos em canais radiculares de cães beagle de 6 meses de idade, observaram extensiva destruição tecidual após 6 meses do início do experimento. Os autores ressaltaram a extrema virulência da cepa de microrganismos por eles utilizada para induzir infecção periapical. Allard *et al.* (1987) induziram inflamação perirradicular em 44 canais radiculares de cães de raça indefinida, inoculando *Streptococcus faecalis*, e mantendo selamento coronário por 6 meses.

Em 2001, Ferreira *et al.*, concluíram que 50 µg/mL foi a concentração mínima de endotoxina utilizada para preencher o canal radicular e induzir reação periapical, no menor período possível. Em 2003, Ferreira induziu reações periapicais em dentes de cães utilizando essa metodologia. Após remover a polpa radicular e promover o arrombamento do platô apical, preencheu os canais radiculares com 50 µg/mL de solução aquosa de endotoxina de *Escherichia coli* e selou as câmaras pulpares com resina composta fotopolimerizável. As reações periapicais foram obtidas após o período de 1 a 2 meses.

2.5. AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA DE LESÕES PERIAPICAIS

Em 1929, Gottlieb *et al.* afirmaram que os raios-x não nos dizem se um material obturador endodôntico é irritante, ou nos dão conhecimento quanto ao comportamento do tecido periapical. Os raios-x são de valor para mostrar o crescimento de novo tecido ósseo. Mas, em hipótese alguma, podem os raios-x ser tomados como prova científica fidedigna.

Dixon & Rickert (1938) também registraram sua atenção quanto às limitações da avaliação radiográfica, particularmente no diagnóstico de patologias periapicais.

Seltzer *et al.* (1964), correlacionaram lesões induzidas em cães, histológica e radiograficamente. Concluíram que o tamanho da lesão observada histologicamente, freqüentemente não correspondia aquele observado na radiografia. Usualmente era

maior. Observaram que esta diferença foi provavelmente devido a diversos fatores, entre eles: diferenças de angulação entre tomadas radiográficas, já que é difícil segurar a película na cavidade oral do cão; anatomicamente as cristas ósseas mandibulares do cão superpõem-se aos ápices dos dentes, tornando a visualização da lesão difícil ou impossível; e lesões inflamatórias envolvendo estrutura óssea trabeculada com frequência não foram visualizadas na radiografia.

Snyder *et al.* (1966), em estudo comparativo em dentes de collies com lesão induzida, não encontraram correlação entre o tamanho aparente da lesão, radiograficamente, e a atual extensão da lesão, histologicamente. A ausência de área radiolúcida na radiografia não descartou a presença de área patológica histologicamente.

Rowe & Binnie, em 1977, em dentes de cães com ápices incompletamente formados, correlacionaram a aparência radiográfica com as mudanças histológicas examinando 192 canais radiculares obturados endodonticamente, em pré-molares de cães. Não houve evidência de perda óssea em 129 ápices, mas inflamação periapical foi observada ao redor de 57 deles. Um espessamento periodontal foi observado em 32 dos ápices radiculares, porém ao redor de oito destes os tecidos periapicais estavam normais.

Pitt Ford, em 1984, também investigou a correlação entre exames radiográficos e histológicos de lesões periapicais em dentes de cães beagles. No geral, quando a extensão da inflamação aumentava o mesmo ocorria com o tamanho das lesões radiográficas. Por causa do formato da mandíbula dos cães beagles, não foi possível, durante a vida dos animais, tomar radiografias que dispusessem os dentes e os tecidos adjacentes claramente. Portanto concluiu o autor que radiografias são um substituto insatisfatório para o exame histológico na detecção de presença ou ausência de doença periapical em cães.

Allard *et al.* (1987) encontraram boa correlação entre seus achados radiográficos e microscópicos, em pesquisa de reparo de dentes cães com lesão periapical induzida tratados endodônticamente.

Leonardo *et al.* (1994) também observaram correlação entre seus achados radiográficos e microscópicos em termos de sucesso de tratamento endodôntico.

Rabang *et al.* (2002) e Ferreira *et al.* (2002a) compararam dois métodos de indução de lesão periapical em cães (com a câmara exposta ao meio oral; com arrombamento apical e selamento da câmara após sete dias de exposição ao meio oral), quanto aos aspectos radiográficos e microbiológicos (por identificação por cultura), respectivamente. Observaram que, radiograficamente, os dentes selados apresentavam reações maiores, e microbiologicamente, apresentavam maior número de anaeróbios estritos em relação aos dentes que permaneceram abertos ao meio oral.

2.6. MICROBIOTA ORAL DO CÃO

Dillon, em 1986, descrevendo a microbiologia canina, relatou que a cavidade oral abriga uma população microbiológica concentrada e variada, que é distinta das áreas próximas, como narinas, nasofaringe e orofaringe. No início da vida, o principal foco das bactérias é o dorso da língua. Com a erupção dos dentes, distintas microbiotas começam a colonizar suas superfícies coronárias e acerca do sulco gengival, formando placa dental. Nos primeiros dias de vida, uma microflora predominantemente formada (90%) por *Streptococcus* é estabelecida. Outras bactérias desenvolvem-se à medida que o animal vai amadurecendo. Algumas espécies, como espiroquetas e *Bacteroides*, cujo habitat é o sulco gengival, não estão presentes até a erupção dos dentes. Alguns organismos Gram-positivos podem precipitar a formação de cáries dentais, embora esta ocorrência não seja consistentemente relatada em cães (Schneck, 1967). Bactérias podem invadir os tecidos moles, porém infecção é raramente estabelecida porque há uma resistência local. Contudo, a microbiota oral do cão tem grande potencial de virulência quando introduzida em outros tecidos (Goldstein *et al.*, 1984; Dillon, 1986).

Saphir & Carter, em 1976, isolando e identificando a microbiota aeróbica encontrada em esfregaço gengival de cães, descreveram-na como sendo composta de:

Streptococcus (82%), *Staphylococcus* (60%), *Actinomyces* (14%), *Escherichia coli* (22%), *Corynebacterium* (26%), *Pasteurella* (22%), *Caryophanon* (20%), *Mycoplasma* (83%), *Acinetobacter* (10%), *Moraxella* (40%), *Neisseria* (20%), *Enterobacter* (2%), e *Bacillus* (12%).

Misirilgil & Tuncer, em 1990, afirmaram que os dados disponíveis sobre a microbiota bacteriana oral de cães eram limitados. Em sua pesquisa, identificaram 100 espécimes isolados da cavidade oral desses animais. Apenas 17 diferentes espécies foram isoladas, aeróbicas e anaeróbicas: houve predominância de *Staphylococcus* (coagulase + e -), e *Escherichia coli*, levando os autores a concluir que a predominância destas bactérias em seus achados ocorreu pelo hábito que o cão tem de lamber.

Rayan *et al.*, em 1991, compararam a microbiota oral de humanos, cães e gatos e encontraram um maior número de anaeróbios em relação ao de aeróbios nos três grupos estudados. O número total de microrganismos encontrados nos animais foram maiores no gato, seguido pelo cão e pelo homem, em ordem decrescente. “*Bacteroides*” somente foram encontrados nos humanos (em duas espécies – “*B. Intermedius*” e “*B. disiens*”) e nos cães (em quatro espécies – *B. capillosus*, “*B. loescheii*”, “*B. asaccharolyticus*”, “*B. gingivalis*”, e “*B. bivia*”. Também foram encontrados, preferencialmente nos cães, *Fusobacterium nucleatum* e *Fusobacterium necrophorum*.

Goldstein (1992), Brook (1992) e Allaker *et al.* (1992), estudando a microbiota oral nativa dos cães, relataram que *Streptococcus* spp., *Staphylococcus intermedius*, *Haemophilus* spp., *Eikenella corrodens*, *Pasteurella multocida* e *Neisseria* spp. são espécies freqüentemente isoladas da boca do cão.

Nieves *et al.* (1997) identificaram as bactérias de amostras de placa dental em dentes de cão e verificaram que a maioria das espécies isolada era Gram-negativas, representadas em 90% por *Pasteurella* spp, e *Pseudomonas* spp. Os 10% restantes eram *Actinobacillus* ssp, *Aeromonas* ssp, *Branhamella* ssp, e *Escherichia coli*. Cinquenta e oito por cento das bactérias Gram-positivas isoladas eram *Streptococcus* spp. Os 42% Gram-positivos restantes eram *Actinomyces* ssp (26%) e

Corynebacterium spp (16%). Dentre os anaeróbios estritos 39% eram *Bacteroides* spp. Os 61% anaeróbios restantes eram *Prevotella* spp (13%), *Clostridium* spp (8.7%), *Fusobacterium* spp (8.7%), *Porphyromonas* spp (8.7%), e *Propionibacterium* spp (8,7%); seguidos de *Lactobacillus* spp (4.4%), *Peptostreptococcus* spp (4.4%), e *Streptococcus morbillorum* (4,4%).

Allaker *et al.* (1997a), estudando a prevalência de espécies de *Porphyromonas* e *Prevotella* em placas dentais de 34 cães, encontraram que *Porphyromonas gingivalis* estavam presentes em 68% dos cães e em 47% das amostras das placas. A contagem de *P. gingivalis* aumentou com a quantidade de placa e com o grau de gengivite. *Prevotella intermedia*, também relacionada com a quantidade de placa e grau de gengivite, estava presente em 44% dos cães e em 23% das placas dentais. Esses autores também encontraram uma correlação significativa entre a quantidade de placa, a extensão de gengivites e a idade do cão.

Segundo Dillon (1986), a exposição pulpar e conseqüente necrose só ocorre em 10% dos cães. Entretanto, a microbiota desses canais infectados é pouco conhecida.

Gadê Neto (2000) analisando pelo método de cultura a microbiota de canais radiculares de dentes de cães com lesão periodontal induzida, observou no periodonto a prevalência de *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella*, *Staphylococcus*, *Neisseria*, *Bacteroides*, *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Porphyromonas* e *Clostridium*. No canal radicular, com tecido pulpar ainda vivo, encontrou *Streptococcus*, *Neisseria*, *Pasteurella*, *Cardiobacterium* e *Actinomyces*.

Ferreira *et al.*, em 2001, utilizando metodologia de identificação por cultura, investigaram a microbiota de dentes de cães com lesão periapical induzida com e sem endotoxina bacteriana. Encontraram maioria de anaeróbios estritos como *Prevotella oralis*, *Prevotella loescheii*, *Porphyromonas endodontalis*, *Peptostreptococcus productus*, *Peptostreptococcus assaccharolyticus*, *Peptostreptococcus prevotii*, *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptostreptococcus magnus* e *Peptostreptococcus hydrogenalis*. Outros anaeróbios estritos encontrados foram *Eubacterium lentum*, *Fusobacterium lentum*, *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium necrogenes* e *Veillonella* ssp. Anaeróbios facultativos como *Aerococcus*

viridans, *Micrococcus* ssp. *Staphylococcus lentus* e *Staphylococcus intermedius* também foram encontrados.

Rabang, em 2003, identificou em dentes de cães com lesões periapicais induzidas, em que os canais radiculares permaneceram expostos ao meio oral, maioria de facultativos. Em ordem decrescente, foram isolados: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Neisseria*, *Propionibacterium*, *Actinomices*, *Prevotella*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Clostridium*, *Lactococcus*, *Peptostreptococcus*, *Abiotrophia*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* e *Porphyromonas*.

Ferreira *et al.*, em 2006, investigaram a composição da microbiota de canais de dentes de cães com lesões periapicais induzidas por 2 diferentes métodos: canais abertos e selados. Os dentes do Grupo 1 (n=16) permaneceram abertos por uma semana e depois foram selados com uma resina composta por 120 dias. Os dentes do Grupo 2 (n=16) permaneceram abertos pelo mesmo período de tempo. Amostras microbiológicas foram coletadas dos canais radiculares e processadas, os microrganismos foram então identificados e contados pela técnica anaeróbica de identificação, após o estabelecimento das lesões periapicais. Setenta e quatro isolados cultiváveis foram identificados nos canais selados (Grupo 1). Os aneróbios estritos num total de 64% de todas as espécies isoladas, com 55,4% de Gram-negativos. Os gêneros mais encontrados foram *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium* e *Porphyromonas*. Houve associação estatisticamente significativa entre os dentes selados e anaeróbios estritos ($p>0.05$). Nos dentes abertos (Grupo 2), de um total de 58 isolados cultiváveis 19% foram anaeróbios estritos e 81% foram facultativos, com predominância de espécies Gram-positivas (75%). Os gêneros mais frequentemente isolados foram *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Neisseria* e *Prevotella*. Concluíram os autores que, o método que induziu lesões inflamatórias periapicais por exposição ao meio oral, seguida de selamento do dente, produziu uma microbiota do canal radicular similar à mesma encontrada no homem.

2.6.1. DIFERENÇAS ENTRE OS MICRORGANISMOS IDENTIFICADOS EM CÃES E A MICROBIOTA HUMANA

Estudo realizado por Laliberté & Mayrand (1983) mostrou que espécies de *Porphyromonas gingivalis* isoladas de cães eram semelhantes às isoladas de amostras humanas, com exceção de algumas espécies caninas que podem ser catalase-positiva

Fournier & Mouton, em 1993, investigaram 68 cepas de *Porphyromonas gingivalis*, 31 de origem humana e 37 de origem animal, quanto à diferenças em aspectos tais como, bioquímica, fluorescência, catalase, hemaglutinação e cromatografia gasosa. Encontraram, além de pequenas diferenças bioquímicas, catalase e hemaglutinação positiva e pigmentação mais rápida em algumas cepas. Concluíram que havia heterogeneidade dentro da espécie, que poderia ser separada em dois grupos distintos, um oriundo de uma fonte animal e o outro de humanos.

Em 2001, Fournier *et al.*, através da comparação pela homologia de DNA com seqüência do gene 16S rRNA, propuseram uma nova espécie, *Porphyromonas gulae* (catalase positiva), isolada do sulco gengival de animais e distinta da *Porphyromonas gingivalis* (catalase negativa) de origem humana.

Conrads *et al.*, (2004) isolaram quatorze cepas de bacilos Gram-negativos, anaeróbicos, não-esporulados, fluoroquinolona resistentes, coletados de gatos e cães, assim como de ferimentos de humanos que haviam sido mordidos por gatos ou cães. Estas cepas foram caracterizadas por seqüenciamento 16S-23S rDNA, 16S rDNA, DNA-DNA *hybridization*, análise filogenética e testes fenotípicos. Os resultados indicaram que essas novas cepas pertencem a uma espécie distinta, intimamente relacionada ao *Fusobacterium nucleatum*. A espécie *Fusobacterium canifelinum* sp. nov. foi então proposta.

3. PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente estudo em dentes de cães com lesão periapical induzida, por exposição dos canais radiculares à contaminação do meio oral pelo período de 120 dias, foram:

1. Investigar a relação entre o tamanho da lesão periapical induzida, o comprimento do dente e a microbiota identificada;
2. Investigar a composição da microbiota dos canais radiculares de dentes de cães com lesão periapical induzida antes e após o preparo químico-mecânico pelo método da cultura e pelo método do *checkerboard* DNA-DNA *hybridization*; e
3. Avaliar a ação antimicrobiana da clorexidina gel (CHX) 2% e do hipoclorito de sódio (NaOCl) 5,25% associado ao ácido diaminotetracético (EDTA) 17%, quando utilizados no preparo químico-mecânico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DOS CÃES E AMOSTRAS

Para o desenvolvimento desta pesquisa foram utilizados quatro cães, fêmeas (*canis familiaris*), sem raça definida, pesando de 10 a 14 Kg, com aproximadamente 12 a 18 meses de idade, de aparência sadia. Provenientes do Canil Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), a partir de doação pela Prefeitura local, os cães haviam sido vacinados (anti-rábica - Defensor, Pfizer Animal Health, New York, U.S.A.), vermifugados (Canex - SESPO, Paulínia, SP) e submetidos à quarentena. Previamente ao início do experimento, o projeto de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP (CEEa – IB – Protocolo nº 380-2/2002) e aprovado em 07/06/2002 (**ANEXO 1**).

Durante o período do experimento os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) – UNICAMP, em baias limpas e arejadas, tratados com ração canina balanceada (Ração Pedigree High Performance – Masterfoods South America, Mogi Mirim, SP) e água *ad libitum*. Seu manuseio seguiu normas previstas pela Lei Federal nº 6.638, de 8 de maio de 1979 (Vieira & Hossne, 1998).

Foram selecionados segundos (P_2), terceiros (P_3) e quartos (P_4) pré-molares, da arcada inferior, totalizando 21 dentes, intactos, livres de cárie e doença periodontal, apresentando então boas condições clínicas e ausência de lesão periapical. As mesmas manobras e técnicas operatórias foram seguidas em todos eles.

4.2. ANESTESIA

Previamente a cada intervenção, os animais estiveram em jejum por 12-24 horas, mas acesso a água foi irrestrito. Isto foi importante não apenas para reduzir o risco de vômito, mas também o risco de intussuscepção (Green, 1979).

A conduta anestésica utilizada, descrita por (Massone, 1999), é reconhecidamente mais prática e segura.

Para cada intervenção, os animais foram pré-anestesiados, recebendo uma injeção subcutânea de sulfato de atropina (Atropina 1% - Fraga - Farmagráfica S. A. Importação e Exportação – Mairiporã, SP), no intuito de diminuir a salivação e neutralizar as arritmias que pudessem ocorrer (Fischer & Klinge, 1994), na dosagem de 0,044 mg/Kg de peso do animal, utilizando-se seringa de 1 mL (insulina). Após um período de 15 minutos, procedeu-se a anestesia com uma associação de xilasina (Rompun - Bayer S.A. Saúde Animal, São Paulo, SP) e ketamina (Francotar - Virbac do Brasil Ind. e Com. Ltda, Roseira, SP) (Moreland & Glaser, 1985; Fischer & Klinge, 1994; Gadê-Neto, 2000), nas dosagens de 1 mg/Kg e 15 mg/Kg respectivamente, injetada por via intramuscular.

Este protocolo produziu boa anestesia e relaxamento, proporcionando um considerável tempo de trabalho, entre 30-40 minutos (Moreland & Glaser, 1985; Fischer & Klinge, 1994; Gadê-Neto, 2000, 2002, 2004). No decorrer da intervenção, foi necessário manter o procedimento anestésico com aplicação de doses complementares, constituídas de metade da dosagem inicial da associação xilasina/ketamina, via intramuscular.

Na realização dos procedimentos intra-orais, o animal foi colocado em posição decúbito dorsal, com manutenção da abertura bucal através da interposição de um abridor de boca entre os caninos.

4.3. CRONOGRAMA DO EXPERIMENTO POR CÃO

4.3.1. 1ª INTERVENÇÃO

- indução das lesões periapicais;
- acesso aos dentes, deixando-os abertos por 120 dias; e
- controle radiográfico.

4.3.2. INTERVENÇÕES DE CONTROLE CLÍNICO E RADIOGRÁFICO

- 15, 30, 60 e 90 dias.

4.3.3. 2ª INTERVENÇÃO

- exame radiográfico (constatação das lesões);
- coleta microbiológica inicial dos dentes induzidos;
- preparo químico-mecânico;
- coleta microbilógica após preparo químico-mecânico; e
- obturação dos canais radiculares e selamento coronário.

4.4. INDUÇÃO DAS LESÕES PERIAPICAIS (1ª INTERVENÇÃO)

4.4.1. FASE INICIAL DO EXPERIMENTO

Previamente às intervenções, foram feitas radiografias periapicais para diagnóstico dos dentes selecionados, com a finalidade de observação das condições de normalidade radicular. Nas tomadas radiográficas, utilizou-se aparelho de Raios-X (Modelo Time-X 66 – Gnatus Equipamentos Médico-Odontológicos Ltda, Ribeirão Preto, SP) e tempo de exposição padronizado em 0,6 segundos. A técnica foi a do paralelismo (Freitas *et al.*, 2000), com posicionador radiográfico infantil (Prisma Instrumentos Odontológicos Ltda, São Paulo, SP). Utilizou-se filme Ultra-speed (Eastman Kodak, Rochester, NY - USA) e as radiografias foram realizadas em duplicata, sendo uma revelada manualmente pelo método tempo/temperatura e outra processada automaticamente (Dent-X 9000 - AFP Imaging Corporation, Elmsford, NY - USA).

Visando o início do experimento em condição de saúde oral semelhante para todos os cães, os dentes selecionados foram submetidos à raspagem coronária e profilaxia com ultra-som, na primeira intervenção (**FIG. 1-A e B**).

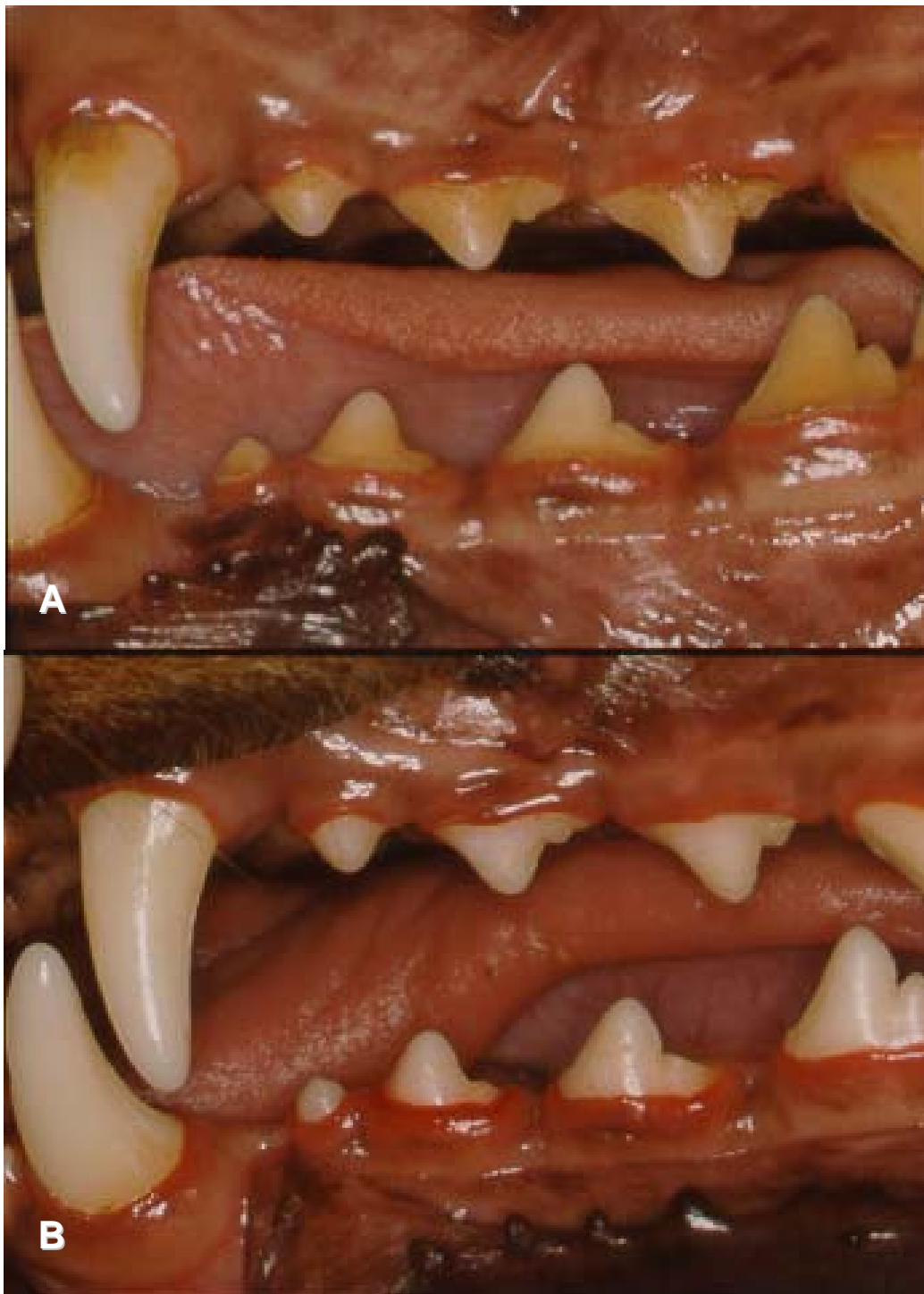


FIGURA 1- Aspectos clínicos: **A-** Antes da profilaxia com ultra-som; **B-** Após a profilaxia com ultra-som.

4.4.2. INDUÇÃO DAS LESÕES PERIAPICAIS

Todos os procedimentos clínicos foram feitos por um único operador. Para melhor visualização do campo operatório (Souza-Filho & Teixeira, 1999), estes foram realizados com a utilização de microscópio operatório clínico (MOC) (Modelo M900, DF Vasconcelos, São Paulo, SP) (**FIG. 2**).

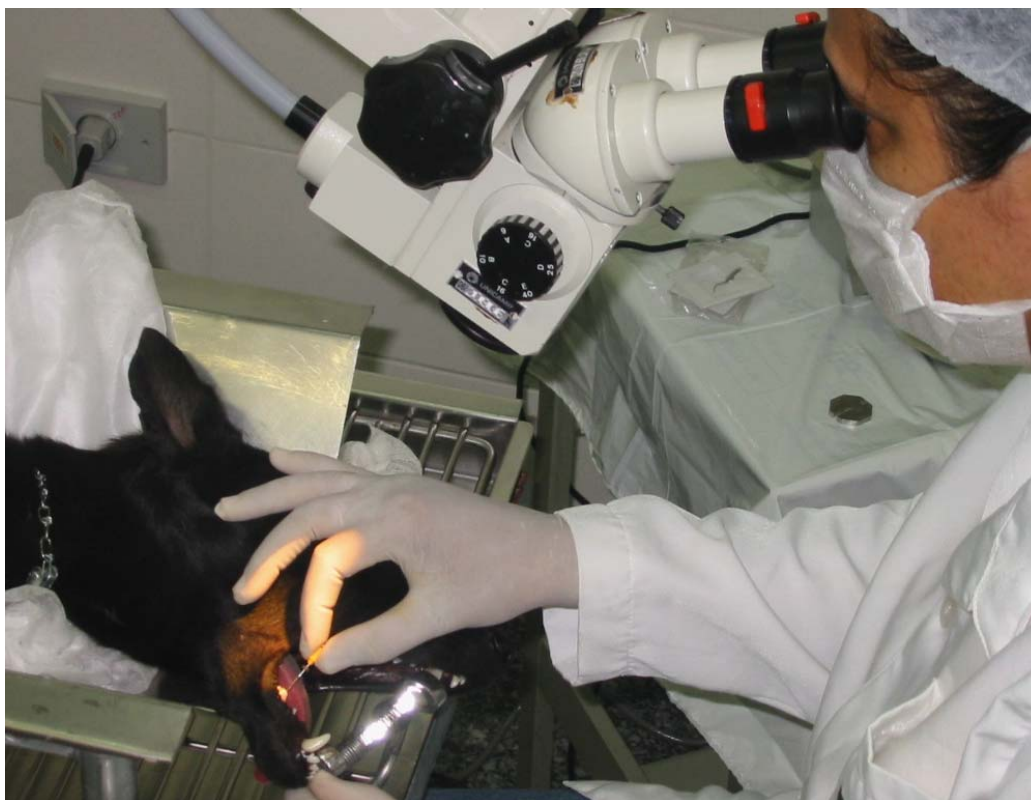


FIGURA 2- Aspectos clínicos da indução de reação periapical com auxílio de microscópio operatório clínico.

Todo o instrumental e material utilizados nos procedimentos operatórios foram esterilizados em autoclave (Autoclave Cristófoli H 3000 – Cristófoli Equipamentos de Biossegurança Ltda, Campo Mourão, PR) a 135°C, por 20 minutos.

Depois da tomada radiográfica inicial, raspagem e profilaxia coronária, foi realizada a anestesia terminal infiltrativa à base de cloridrato de lidocaína com adrenalina 1:100. 000 (Lidocaína 100 – DFL Indústria e Comércio Ltda, Rio de Janeiro, RJ).

A seguir, nos dentes selecionados, foram procedidas as aberturas coronárias com pontas esféricas diamantadas nº 1011 (KG Sorensen - KG Sorensen Ind. Com. Ltda, Barueri, SP), montadas em turbina de alta rotação, refrigeradas a ar e água. O ponto de eleição para o início do acesso à câmara pulpar foi em direção ao corno pulpar mais proeminente, localizado abaixo da maior cúspide do dente (**FIG. 3-A**). As aberturas oclusais foram complementadas com pontas diamantadas tronco-cônicas de extremidade inativa nº 3082 (KG Sorensen Ind. Com. Ltda, Barueri, SP) dando a conformação apropriada à cavidade, de acordo com a anatomia interna do dente, removendo-se todo o teto da câmara pulpar (**FIG. 3-B**). Para proporcionar um acesso livre e reto aos canais radiculares (**FIG. 3-C**) foi realizado desgaste compensatório, com a utilização de brocas de Largo nº 2 (Maillefer Instruments, Baillagues - Switzerland).

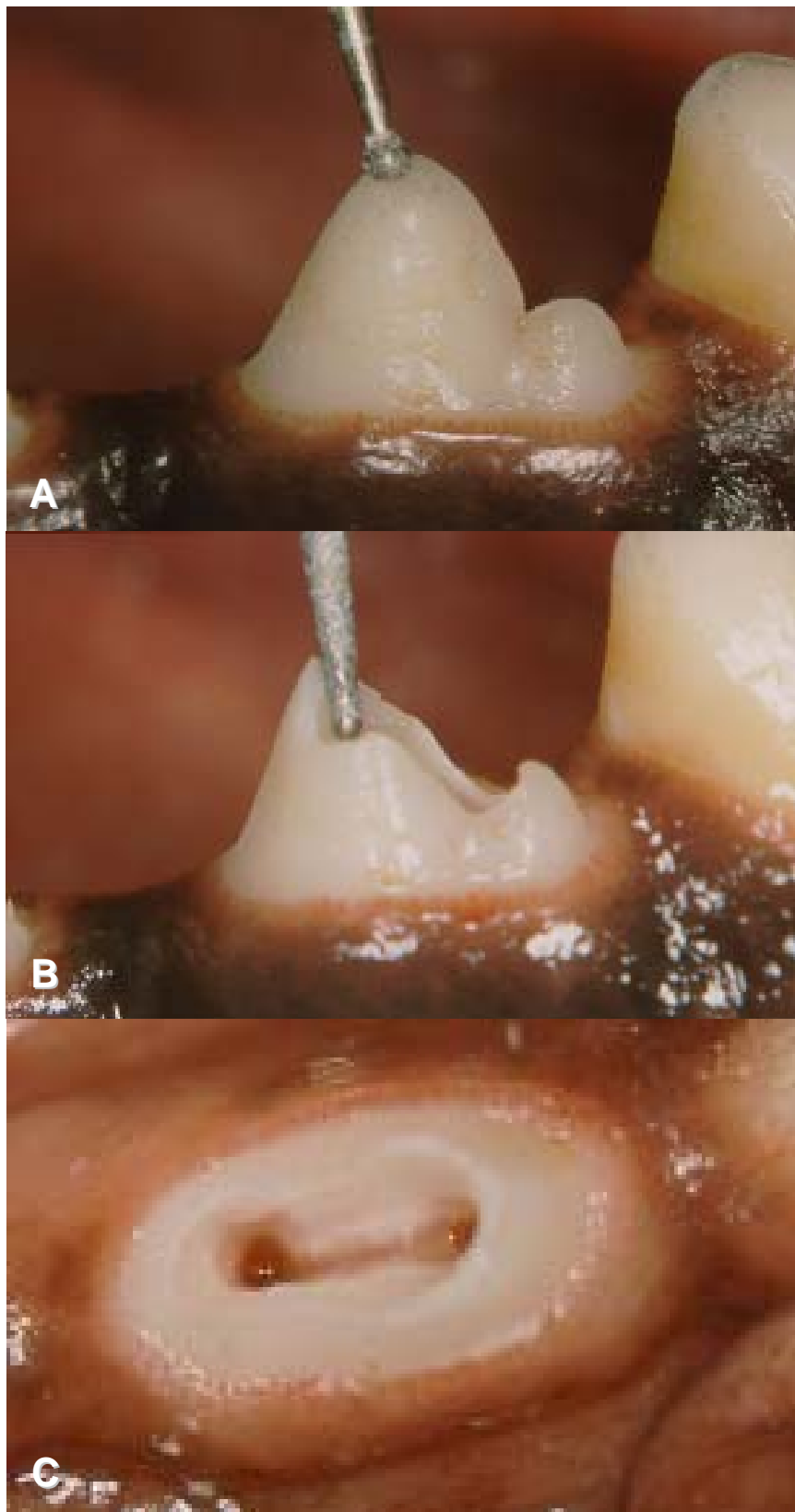


FIGURA 3– Aspectos da abertura coronária: **A-** Ponto de eleição; **B-** Forma de contorno; **C-** Forma de conveniência.

Removida a polpa coronária, realizou-se irrigação da câmara pulpar com soro fisiológico (NaCl 0,9%). A seguir, com base nas radiografias para diagnóstico (**FIG. 4**), efetuou-se a exploração dos canais radiculares com lima tipo-K nº 15 (Maillefer Instruments, Baillagues - Switzerland) até que fosse atingida a parada ou platô apical, estrutura anatômica que se situa aproximadamente de 1,5 a 2 mm do ápice dentário (Soares, 1999), e que serviu-nos como referencial. Confirmado este nível para a determinação do Comprimento Real de Trabalho (CRT), através de tomada radiográfica periapical, procedeu-se o acesso aos canais radiculares para extirpação pulpar. Utilizaram-se, seqüencialmente, brocas de *Gates-Glidden* (Maillefer, Baillagues - Switzerland) de números 3 e 2, seguidas por limas tipo-Hedströen de números 20 a 30 (Hedströen File Colorinox, Baillagues - Switzerland), para auxiliar na remoção do tecido pulpar, sob copiosa irrigação com soro fisiológico e aspiração.



FIGURA 4- Aspecto de radiografia periapical inicial.

Os dentes permaneceram abertos, com exposição da cavidade pulpar ao meio oral, por aproximadamente 120 dias (Snyder *et al.*, 1966), para que houvesse a

contaminação microbiana, e se instalassem lesões periapicais detectáveis radiograficamente.

Ao término de todas as intervenções, os animais foram acomodados em local isolado, com ventilação e temperatura adequadas, para a reanimação pós-anestésica.

4.5. INTERVENÇÕES DE CONTROLE CLÍNICO E RADIOGRÁFICO

Após procedimentos anestésicos, controles clínicos e radiográficos foram efetuados aos quinze dias, e depois mensalmente, até observação de imagens radiolúcidas, sugestivas de lesão periapical crônica, o que ocorreu após aproximadamente 120 dias, quando os cães sofreram nova intervenção. Neste momento, foram repetidos os procedimentos anestésicos, o exame clínico intra-oral foi conduzido para observação de possíveis condições de anormalidade, como fraturas ou fístulas. Em seguida, foram feitas tomadas radiográficas, segundo os mesmos parâmetros descritos na fase inicial do experimento, para constatação da presença de lesão periapical crônica.

4.6. PROCEDIMENTOS CLÍNICOS (2ª INTERVENÇÃO)

Com a constatação do estabelecimento das lesões periapicais, os animais foram novamente anestesiados, nova profilaxia com ultrassom e registros radiográficos periapicais foram procedidos. Para as coletas microbiológicas que seriam procedidas durante a 2ª Intervenção, foram seguidos princípios descritos em protocolo.

4.6.1. PROTOCOLO PARA COLETA DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Princípios, previamente detalhados na literatura por Gomes *et al.* (1994a,b); Gomes (1995); Gomes *et al.* (1996a,b,c); Gomes (2002), foram observados nos procedimentos de coleta das amostras dos canais radiculares:

1. Utilização de técnicas assépticas durante a coleta da amostra.
2. Remoção dos contaminantes coronários.
3. Isolamento absoluto do dente.
4. Descontaminação do campo operatório.
5. Promoção de um fácil acesso aos instrumentos utilizados para coleta das amostras.
6. Evitar contaminação química do espaço pulpar.
7. Coletar amostras eficientemente e efetivamente.

Portanto, antes dos procedimentos de coleta da amostra propriamente ditos, foram realizadas raspagem e profilaxia coronária com ultra-som, e o isolamento absoluto foi procedido com lençol de borracha, preso ao arco de Ostby e fixado com auxílio de grampos. A seguir, promoveu-se o vedamento da interface coroa/lençol com cianocrilato (Super Bonder – Loctite Brasil Ltda, Itapevi, SP) (Otoboni Filho, 2000), para evitar a infiltração com saliva. Em seguida, a primeira descontaminação do campo operatório (dente, grampo, lençol de borracha, arco e cianocrilato) foi feita com a utilização de swabs esterilizados umedecidos primeiramente em água oxigenada (H₂O₂) a 30% (v/v), e depois em hipoclorito de sódio (NaOCl) 5.25% (Proderma, Farmácia de Manipulação, Piracicaba, SP) por 30 segundos cada, sendo subsequente neutralizados com solução de tiosulfato de sódio a 5% (Möller, 1966; Pinheiro *et al.*, 2003).

4.6.2. COLETA MICROBIOLÓGICA INICIAL (C1)

Após a primeira descontaminação do campo operatório, foi promovida cuidadosa remoção dos detritos que preenchiam a câmara coronária (**FIG. 5-A**) com a utilização de sonda exploradora reta (**FIG. 5-B**). Em seguida, executou-se a descontaminação da câmara com a utilização de *microbrush* (*Microbrush-original disposable applicators* – Microbrush Corporation - USA) umedecido em H_2O_2 a 30% (v/v), e depois em NaOCl 5.25% (**FIG. 5-C**), por 30 segundos cada. Com o intuito de evitar a contaminação química do espaço pulpar, o excesso de NaOCl 5,25% do *microbrush* foi removido em gaze esterilizada. Logo após sua aplicação, para neutralizar a ação química dos agentes antissépticos, outro *microbrush* umedecido em solução de tiosulfato de sódio a 5% foi utilizado (Möller, 1966; Pinheiro *et al.*, 2003).

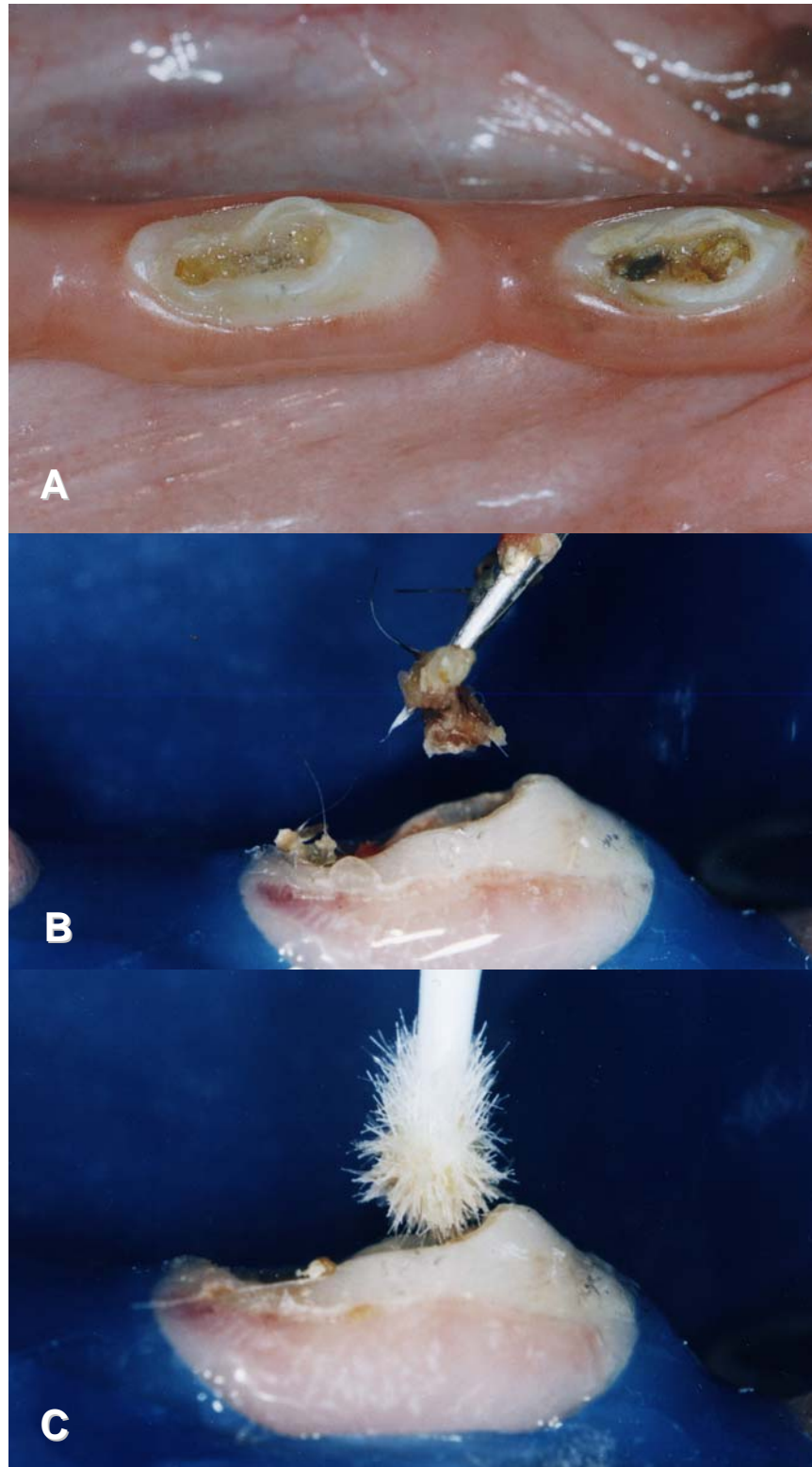


FIGURA 5- Aspectos clínicos da descontaminação da câmara coronária: **A-** Câmaras coronárias preenchidas com detritos; **B-** Remoção de detritos de câmara coronária com sonda exploradora; **C-** Procedimento de descontaminação da câmara coronária.

A esterilidade da coroa e isolamento absoluto foi checada com um *swab* que foi plaqueado em placas de *Fastidious Anaerobe Agar* (FAA – Lab M, Bury – UK) acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado e incubados em condições de aerobiose e anaerobiose (Vianna, 2006).

Foram individualizados, para cada dente, os jogos de instrumentais estéreis utilizados, de forma que não houvesse nenhum tipo de contaminação.

A seguir, seqüencialmente, três pontas de papel absorventes esterilizadas nº 25 foram introduzidas no CRT, por 60 segundos cada (Kobayashi *et al.*, 1990). Cada uma das pontas absorventes, ao ser removida do canal, foi imediatamente introduzida em tubo tipo *Eppendorf* (Microtubes MCT-150-C, 1.5 mL Clear – Axygen Inc, Union City, CA - USA) esterilizado contendo três bolinhas de vidro e 1 mL de meio de transporte pré-reduzido RTF (*Reduced Transport Fluid*) (Syed & Loesche, 1972) (**FIG. 6**). A adição das bolinhas de vidro tem por finalidade produzir uma dispersão satisfatória das bactérias das pontas de papel no meio de transporte, quando da sua agitação (Kobayashi *et al.*, 1990; Wikström *et al.*, 1993). Esse tubo, vedado com parafilme, devidamente identificado de acordo com o dente do qual a coleta procedia, foi transportado o mais breve possível até o Laboratório de Microbiologia da Disciplina de Endodontia da FOP – UNICAMP, em jarra de anaerobiose, para não saturar as coletas com oxigênio (Ferreira, 2003).

A coleta das amostras dos canais radiculares foi realizada sob fluxo contínuo de nitrogênio, para manter a viabilidade das bactérias anaeróbias (Berg & Nord, 1973). Esse procedimento foi realizado com o auxílio de um cilindro de gás nitrogênio, ao qual se acoplam uma válvula de segurança (White Martins, MOD. R 86-n - São Paulo, SP), uma mangueira e uma cânula aspiradora endodôntica, formando um dispositivo que direciona o gás somente para a região do dente no qual foi realizada a coleta.

O tempo máximo entre a realização da coleta e o seu processamento laboratorial pela técnica de identificação por cultura foi de 4 horas.



FIGURA 6- Aspecto clínico da coleta das amostras microbiológicas.

4.6.3. PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO E DIVISÃO DOS GRUPOS

Após a coleta microbiológica inicial (C1), os terços cervical e médio dos canais radiculares foram instrumentados seqüencialmente com limas tipo-K (Dentsply-Maillefer, Ballaigues – Switzerland) n° 35 a n° 15, removendo-se detritos contidos no interior dos mesmos. Em seguida, foi confirmado o CRT, através de tomada radiográfica periapical do dente com lima tipo-K n° 15, introduzida aproximadamente de 1,5 a 2 mm aquém do ápice radiográfico (área do platô apical). Optou-se por confirmar essa medida pelo fato de que, em alguns dentes, foi observado desgaste das coroas dentárias.

Os canais radiculares foram preparados com a Técnica *Step-back*, empregando-se limas tipo-K (Dentsply-Maillefer) no CRT do diâmetro 25 até a lima tipo-K n° 50, a qual estabeleceu o batente apical, determinando a Lima Anatômica Final (LAF). Em

seguida, foi realizado o escalonamento com recuo progressivo de 1 mm até a limas tipo-K nº 70.

A cinemática empregada durante a instrumentação consistiu na realização de movimentos oscilatórios de penetração até o comprimento desejado, seguido de tentativa de rotação no sentido horário e limagem de encontro às paredes. Esta limagem foi realizada de modo circunferencial envolvendo todas as paredes do canal radicular. No momento em que o instrumento apresentou-se livre no canal radicular foi efetuada a sua troca para o diâmetro subsequente.

Durante toda a instrumentação, e, a cada troca de instrumento (com o objetivo de remover a solução saturada do interior do canal e novamente preenchê-lo com nova solução), foram utilizadas substâncias químicas-auxiliares, segundo os protocolos de cada grupo experimental (n=7) (**TABELA 1**).

TABELA 1- Divisão dos grupos de acordo com as substâncias químicas testadas.

Grupo	Substância química testada	Grupo Dental	Número de Espécimes
G1	NaCl 0,9%	P ₂	7
G2	CHX 2%	P ₃	7
G3	NaOCl 5,25% + EDTA 17%	P ₄	7

No G1 foram empregados 2 mL de solução de NaCl (solução salina) 0.9% (Proderma, Farmácia de Manipulação, Piracicaba, SP) como solução irrigadora, antes do primeiro instrumento e a cada troca de instrumento durante o preparo químico-mecânico.

No G2 o preparo foi realizado com os canais totalmente preenchidos com 2 mL de clorexidina gel 2% (Endogel - Essencial Farma, Itapetininga, SP), sendo esta substância renovada a cada troca de instrumento.

No G3 foram empregados 2 mL da solução de NaOCl 5,25% (Essencial Farma, Itapetininga, SP), antes do primeiro instrumento e a cada troca do instrumento, e, ao final do preparo, foram aplicados 5 mL de EDTA 17% (Mil Fórmulas, Rio de Janeiro, RJ) por um período de 3 minutos.

Em todos os espécimes de todos os grupos, ao final dos procedimentos de preparo descritos, foi realizada irrigação com NaCl 0.9% (Essencial Farma, Itapetininga, SP), sendo que no Grupo 1 e no Grupo 2 foram utilizados 20 mL, enquanto que no Grupo 3, 18 mL (totalizando um volume final de 40 mL em todos os grupos testados).

Os procedimentos de irrigação empregados durante todo o preparo químico-mecânico foram realizados com o auxílio de seringa de 5 mL (Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda, São Paulo, SP) e agulha hipodérmica BD 20 x 5,5 (Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda, São Paulo, SP) pré-curvada, introduzida até o terço médio e terço apical do canal radicular.

A aspiração do conteúdo dos canais radiculares foi realizada com uma cânula aspiradora (Conjunto de aspiração – Colgran, São Paulo - SP) acoplada a uma bomba aspiradora.

4.6.4. COLETA MICROBIOLÓGICA APÓS PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO (C2)

Foi procedida coleta microbiológica após o término do preparo químico-mecânico no intuito de verificar possível redução na microbiota do canal radicular. Para neutralizar a ação das substâncias químicas testadas, os canais onde foi utilizada clorexidina gel 2% foram irrigados com 5 mL de solução estéril contendo 0,5% de Tween 80% e 0,07% de lecitina de soja (Siqueira Jr. *et al.*, 1998; Vianna *et al.*, 2006b) por 1 minuto, enquanto aqueles em que foi utilizado NaOCl 5,25% foram irrigados com

5 mL de solução estéril de tiosulfato de sódio 5% durante 1 minuto (Martinho, 2007; Vianna *et al.*, 2006b). Em seguida, nova amostra microbiológica dos canais (C2) foi coletada com 3 pontas de papel absorvente esterilizadas, seguindo o mesmo protocolo já descrito para a coleta microbiológica inicial (C1).

4.6.5. OBTURAÇÃO DOS CANAIS E SELAMENTO CORONÁRIO

Finalizados os procedimentos da coleta microbiológica após o preparo químico-mecânico (C2), os canais foram irrigados com 4 mL de soro fisiológico, secos com pontas de papel estéreis e obturados.

As obturações de todos os grupos foram realizadas com cones de guta-percha acessórios Medium (Konne Indústria e Comércio de Materiais Odontológicos Ltda., Belo Horizonte – MG) e cimento endodôntico Endométhasone (Specialités – Septodont, Saint-Maurdes-Fossés Cedex - France), pela técnica do cone modelado apical (Cortez, 2002), complementada com condensação lateral.

Os cones principais foram selecionados e devidamente calibrados empregando-se régua endodôntica calibradora (Maillefer Instruments, Ballaigues – Switzerland), de acordo com o último instrumento empregado na confecção do batente apical (lima tipo-K nº 50). Após a calibração os cones foram introduzidos no interior dos canais e uma radiografia periapical confirmou seus limites que ficaram no CRT, de 1,5 a 2 mm aquém do ápice radiográfico (área do platô apical).

O cimento foi preparado de acordo com as especificações do fabricante e levado para o interior dos canais com o próprio cone selecionado. Após o assentamento do cone principal realizou-se a condensação lateral por meio de condensadores digitais (Maillefer Instruments, Ballaigues – Switzerland) e cones acessórios B7 (Konne Indústria e Comércio de Materiais Odontológicos Ltda., Belo Horizonte, MG) que foram colocados envoltos com o cimento endodôntico. Após provar radiograficamente a qualidade da obturação apical, os cones de guta-percha receberam um primeiro corte por meio de condensadores de Paiva (Golgran Instrumentos cirúrgicos e Odontológicos

, São Paulo – SP) aquecidos na embocadura dos canais. Mais dois cortes da obturação com condensadores quentes seguidos de compressão vertical com condensadores frios foram realizados. Deste modo, a obturação ficou aproximadamente 2 mm aquém da embocadura dos canais. Foi realizada cuidadosa limpeza da câmara pulpar (curetas e pelotas de algodão umedecidas em álcool) e em seguida foi inserido Coltosol (Vigodent S/A Indústria e Comércio, Rio de Janeiro – RJ) em incrementos que foram condensados nas embocaduras dos canais (Gadê-Neto, 2004).

Após a conclusão desses procedimentos, os dentes receberam selamento coronário com resina composta (Filtek Z250, 3M, Sumaré, SP), e o isolamento absoluto foi removido.

Após o período de 12 meses dos procedimentos aqui descritos, foram feitas tomadas radiográficas, os cães foram mortos por sobredose anestésica e os tecidos preparados para análise histomorfológica que será objeto de trabalhos futuros.

4.7. ANÁLISE RADIOGRÁFICA DAS LESÕES PERIAPICAIS INDUZIDAS

Para mensurar as imagens das lesões periapicais induzidas (**FIG. 7**), as imagens radiográficas foram capturadas através de *scanner*, sendo então avaliadas pelo *software* Imagelab 98 versão 2.4 (Softium Informática Ltda - São Paulo, SP), e suas dimensões mensuradas segundo área e perímetro (**FIG. 8**), por três diferentes examinadores, em diferentes dias, sem referência aos registros anteriores, obtendo-se uma média de mensuração.



FIGURA 7- Aspecto radiográfico de lesões periapicais induzidas.

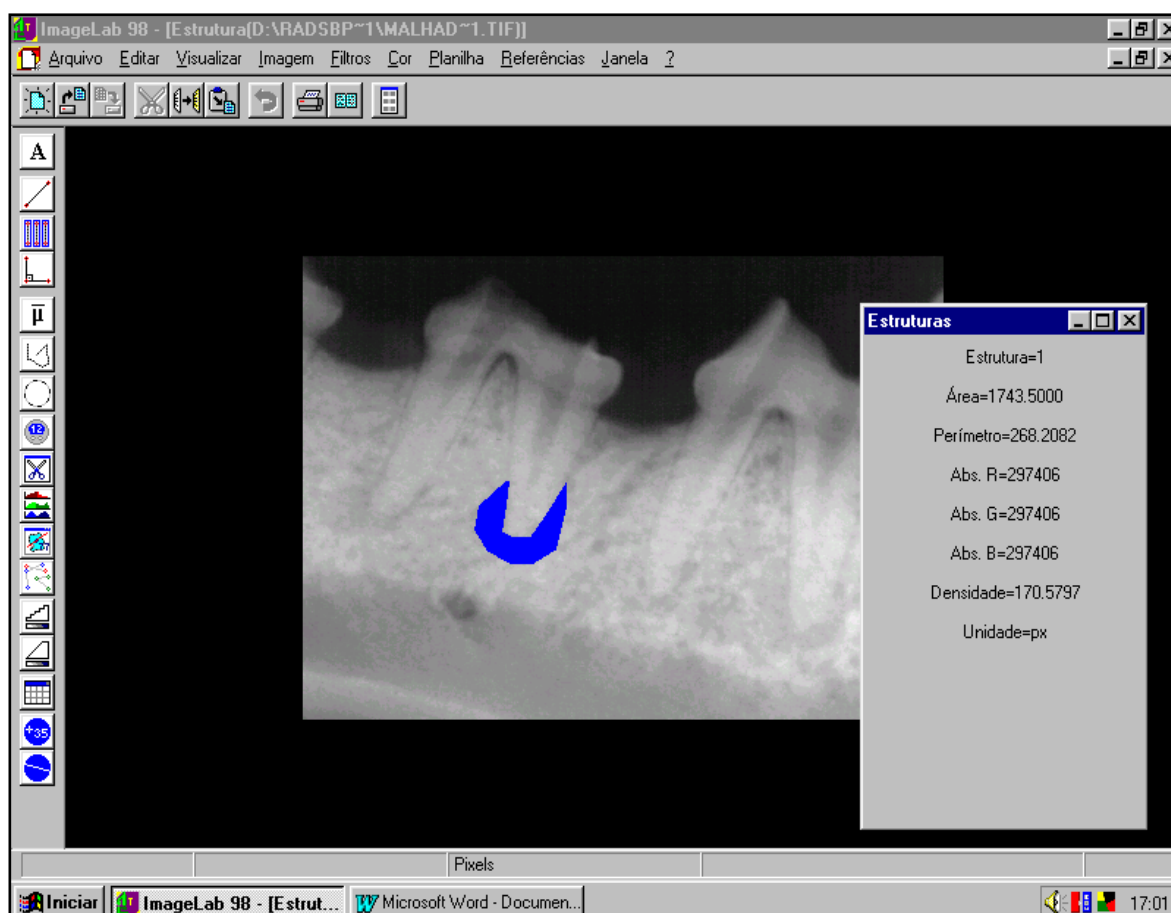


FIGURA 8- Aspecto de mensuração de imagem radiográfica de lesão periapical induzida utilizando o *software* ImageLab.

4.8. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DOS CANAIS RADICULARES

Já no laboratório, no interior da cabine de anaerobiose (Don Whitley Scientific, Bradford - UK) a 37°C, em uma atmosfera de 10% de H₂, 10% de CO₂ e 80% de N₂, cada tubo tipo *Eppendorf* contendo RTF e as pontas de papel absorventes com as amostras coletadas foi agitado mecanicamente (Agitador de tubos tipo vortex modelo MA 162 – Marconi Equipamentos para Laboratórios Ltda, Piracicaba, SP) por 60 segundos, para facilitar a dispersão dos microrganismos.

De cada um dos tubos que continham 1 mL de RTF com as amostras coletadas, foram removidos 150 µL para identificação microbiana por cultura (100 µL para diluições seriadas e 50 µL para isolamento primário de fungos) e 250 µL para identificação microbiana pela técnica do *checkerboard* DNA-DNA *hybridization*; o restante foi congelado para trabalhos futuros.

4.8.1. IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA PELA TÉCNICA DA CULTURA

4.8.1.1. INOCULAÇÃO E INCUBAÇÃO

Ainda na cabine de anaerobiose, dos 100 µL da amostra removidos do referido tubo foram feitas diluições seriadas a 1/10 (10⁻¹), 1/100 (10⁻²), 1/1.000 (10⁻³), e 1/10.000 (10⁻⁴), utilizando FAB (*Fastidious Anaerobe Broth* – Lab M. Limited Topley House, Bury, Lancashire - UK) pré-reduzido (**FIG. 9-A**). Cinquenta µL de cada diluição foram inoculados em placas pré-reduzidas contendo FAA (*Fastidious Anaerobe Agar* - Lab M Limited Topley House, Bury, Lancashire - UK), acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado, contendo ou não meios seletivos para anaeróbios (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire - England) (**FIG. 9-B**). Essas placas foram incubadas na câmara de anaerobiose (**FIG. 9-C**), a 37°C numa atmosfera de 10% de H₂, 10% CO₂ e 80% N₂ até 14 dias, para permitir a detecção de organismos de crescimento lento.

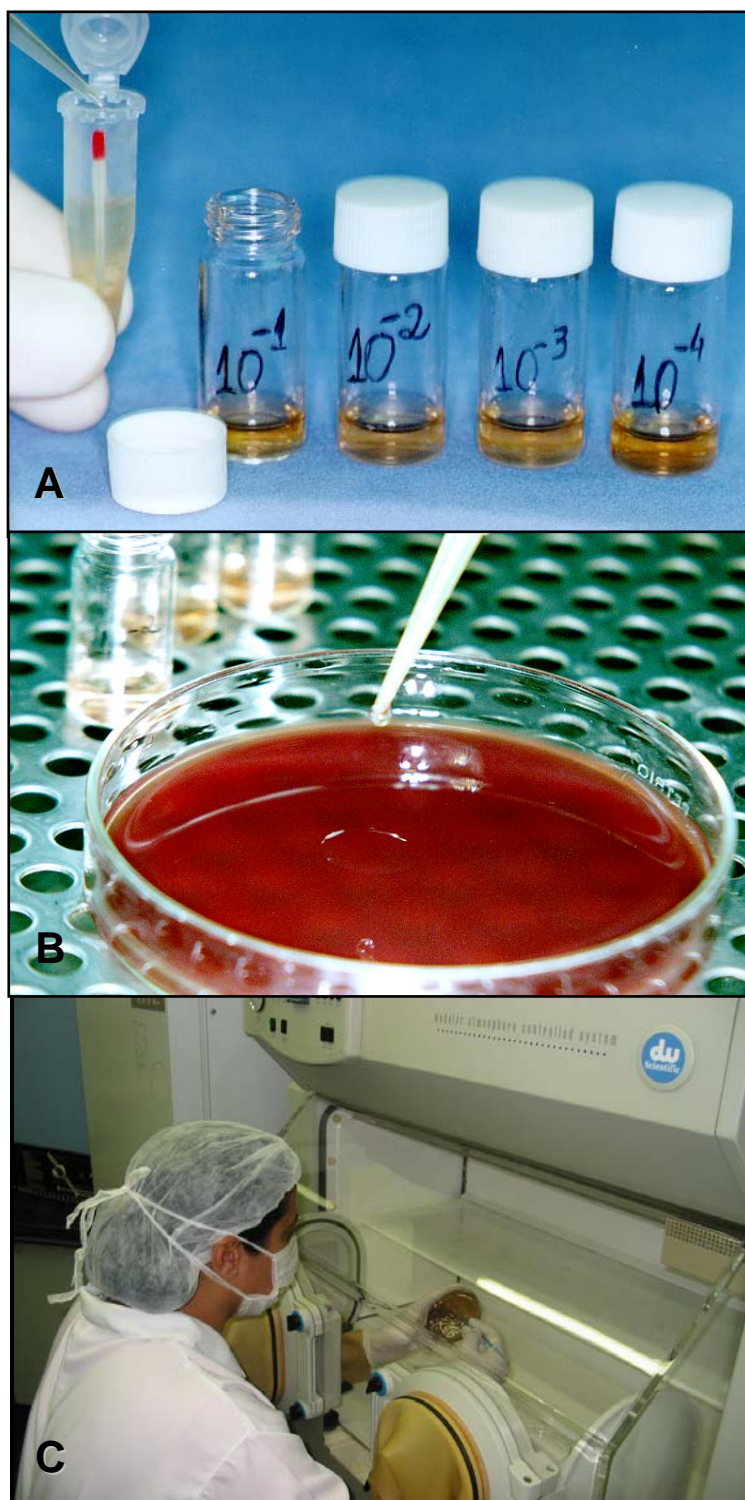


FIGURA 9- Processamento microbiológico das amostras para Cultura: **A-** Diluição seriada da amostra; **B-** Inoculação em placas de agar-sangue; **C-** Incubação em câmara de anaerobiose.

Cinquenta μ L foram também inoculados em uma placa de *Brain Heart Infusion* (BHI – OXOID - Basingstoke, UK) agar sangue, a qual foi incubada aerobicamente a 37°C por 2 dias, para permitir o crescimento de organismos aeróbios ou facultativos.

Para o isolamento primário de fungos, 50 μ L não diluídos do RTF contendo a amostra foram inoculados em uma placa de *Agar Dextrose Sabouraud* (OXOID – Basingstoke - UK) contendo cloranfenicol e incubados à temperatura ambiente por 2 dias. A seguir, as placas foram transferidas para estufa à 37°C, por mais 5 dias.

As amostras do canal radicular foram inoculadas e incubadas como a seguir:

- Placas de ágar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA (*Fastidious Anaerobe Ágar*), acrescidos de hemina (5mg/L) e vitamina K1 (1 mg/L), a 37°C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias, para permitir o crescimento de anaeróbios estritos e facultativos.

- Placas de ágar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA + NAL [ácido nalidíxico, 0.001% (peso/volume)], a 37°C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias, para selecionar anaeróbios Gram-positivos e actinomicetos.

- Placas de ágar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA + NAL + VAN (vancomicina, 0.5 mg/L), a 37°C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias, para selecionar anaeróbios Gram-negativos.

- Placas de ágar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA + VAN + KAN [kanamicina, 0.0075% (peso/volume)], a 37°C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias, para selecionar anaeróbios Gram-negativos (particularmente os "bacilos formadores de pigmento preto").

- Placas de ágar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA + NEO [neomicina, 0.0075% (peso/volume)], a 37°C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias, para selecionar clostrídios e outros anaeróbios.

- Placas de ágar contendo 5% de sangue de carneiro + *Brain Heart Infusion* (BHI) agar (OXOID, Basingstoke, UK), a 37°C, aerobicamente, por 1 dia, para permitir o crescimento de organismos aeróbios ou facultativos.

- Placas de ágar contendo *Sabouraud Dextrose Agar* (OXOID, Basingstoke, UK), a 37°C, aerobicamente, por 2 dias, para permitir o crescimento de leveduras.

O meio de transporte RTF foi preparado de acordo com a fórmula original, descrita por Syed & Loesche, em 1972 (**APÊNDICE 1**). Este estudo utilizou meios de cultura pré-fabricados na forma de pó desidratados, que foram preparados de acordo com as orientações do fabricante (**APÊNDICE 2**).

4.8.1.2. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA

Após a incubação, cada placa (**Fig. 10-A**) foi examinada em lupa estereoscópica (LAMBDA LET 2 - Atto Instruments CO, Hong Kong) em aumento de 3 vezes (**Fig. 10-B**). Os diferentes tipos de colônias foram subcultivadas em meios de culturas recém-preparados, para obter culturas puras de tantas espécies presentes nos canais quanto fossem possíveis para serem estudadas posteriormente. A identificação inicial foi feita de acordo com as características macroscópicas das colônias na placa, observando-se: tamanho, cor, forma, elevação, borda, superfície, textura, consistência, opacidade, efeito no agar e efeito no sangue (nenhum, hemólise parcial, hemólise total).

As colônias puras foram então isoladas em duas placas contendo 5% de sangue de carneiro + FAA, e testadas quanto ao seu requerimento gasoso, colocando-se uma placa na estufa de O₂ (**Fig. 10-C**) e outra na câmara de anaerobiose (**Fig. 10-D**), e observando em qual condição gasosa houve crescimento bacteriano. Ou seja, se cresceram somente em estufa de O₂ eram aeróbias, em ambas: facultativas e se somente na cabine anaeróbica: anaeróbias estritas. As colônias que cresceram somente em anaerobiose foram também plaqueadas em duplicata, sendo que uma placa foi colocada novamente na câmara de anaerobiose e a outra na câmara de CO₂ (IG 150 CO₂ Incubator – JOUAN S.A., Saint-Herblain, Cedex, França), para que se pudesse especificar se eram anaeróbias estritas ou capnófilicas. Em seguida, as culturas puras (**Fig. 10-E**) foram identificadas de acordo com sua morfologia e coloração pelo método do Gram (**Fig. 10-F**) e testadas quanto à produção de catalase (**Fig. 10-G**). Testes bioquímicos apresentados em *kits* (**FIG. 10-H**) padronizados foram utilizados para especificação primária dos microrganismos isolados (**APÊNDICE 3**).

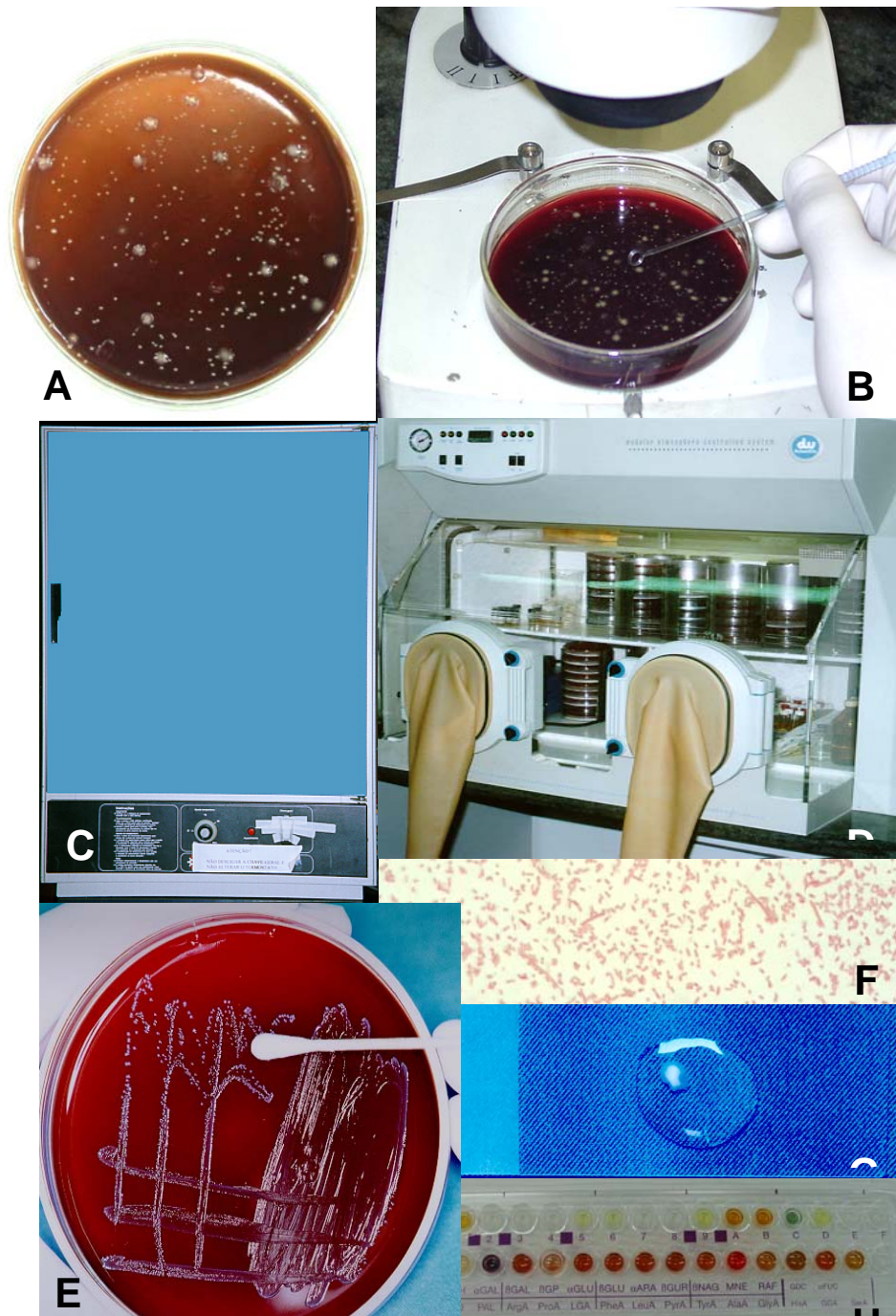


FIGURA 10- Fases da identificação microbiana por Cultura: **A-** Aspecto de cultura primária; **B-** Placa com cultura primária posicionada em lupa estereoscópica para visualização das diferentes características morfológicas das colônias de microrganismos; **C-** Estufa de O₂; **D-** Câmara de anaerobiose; **E-** Cultura pura; **F-** Gram; **G-** Catalase; **H-** Kit de identificação bioquímica.

- RapID 32A (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile - France) para bastonetes e cocos Gram-positivos e Gram-negativos, anaeróbios obrigatórios;
- API Strep (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile - France) para os estreptococos (cocos Gram-positivos, catalase negativa);
- API Staph (Bio Mérieux SA, Marcy-l'Etoile - France) para os estafilococos e micrococos (cocos Gram-positivos, catalase positiva); e
- RapID NH System (Innovative Diagnostic Systems Inc., Atlanta, GA - USA) para *Eikenella*, *Haemophilus*, *Neisseria* e *Actinobacillus*.

4.8.2. IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA PELA TÉCNICA DO *CHECKERBOARD* DNA-DNA *HYBRIDIZATION*

A metodologia empregada para a Técnica de *Checkerboard* DNA-DNA *hybridization* seguiu a descrição feita por SOCRANSKY *et al.*, em 1994.

4.8.2.1. EXTRAÇÃO DO DNA MICROBIANO

Os tubos tipo *Eppendorf* com 250 µL das amostras (**FIG 11-A**) que continham cones de papel e bolinhas de vidro foram agitados no *Vortex* (Agitador de Tubos) antes que os mesmos fossem removidos, com auxílio de pinça estéril. Após esse procedimento, os tubos foram centrifugados a 12.000 RPM por 5 minutos (**FIG 11-B**). O sobrenadante neles contido foi então descartado e o *pellet* ressuspensionado com 150 µL de solução TE e 100 µL de solução de hidróxido de sódio (NaOH).

As suspensões contendo as amostras coletadas foram fervidas em banho-maria por dez minutos (**FIG 11-C**) e em seguida neutralizadas pela adição de 0,8 mL de 5 M

de acetato de amônia ($C_2H_7NO_2$). Com isto, as células bacterianas eram lisadas e o DNA ficava suspenso na solução (**Fig 11-D**).

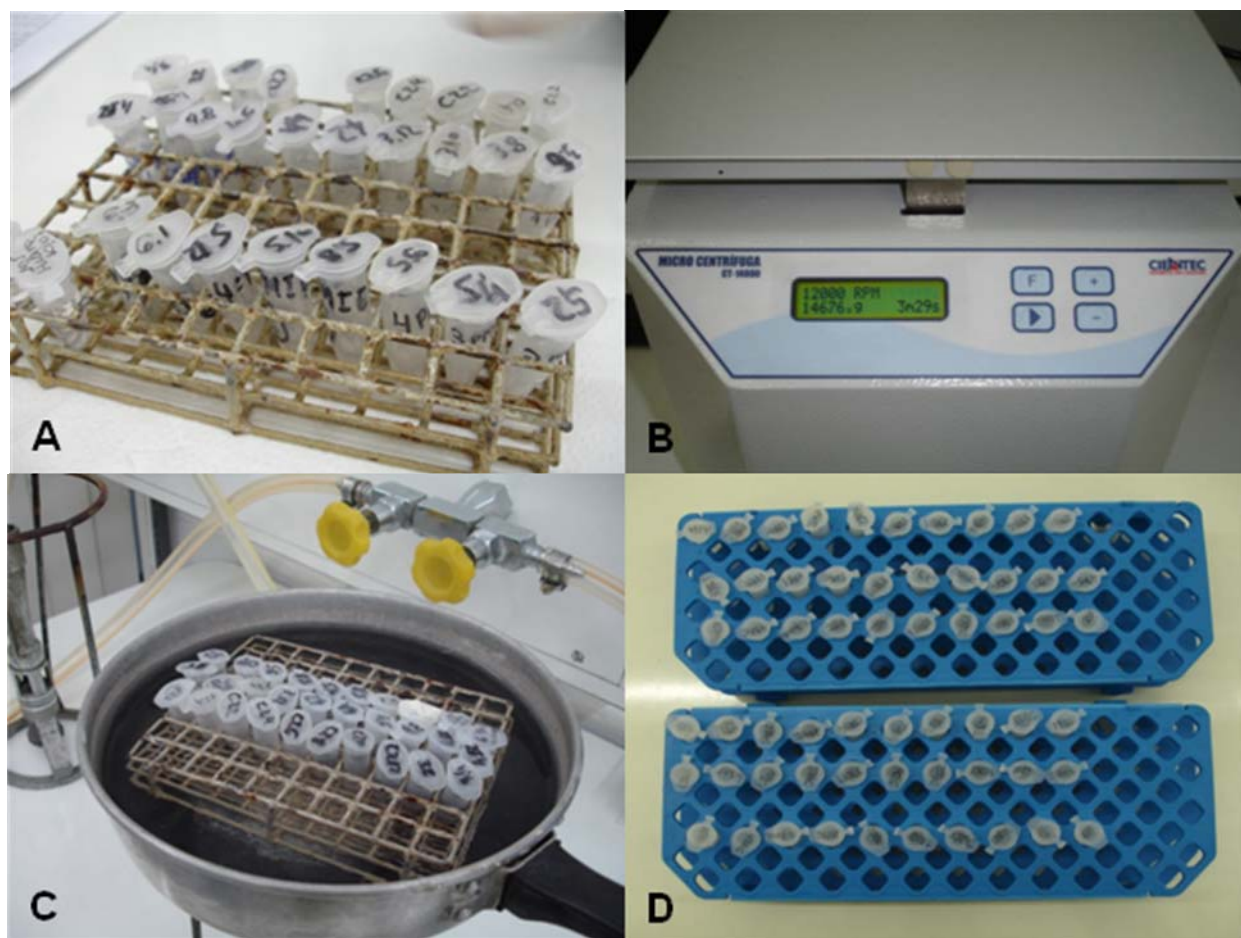


FIGURA 11– Procedimentos para a extração do DNA das amostras: **A**- Tubos tipo *Eppendorf* contendo as amostras; **B**- Extração do sobrenadante através de centrifugação; **C**- Fervura das amostras para extração do DNA; **D**- Tubos tipo *Eppendorf* contendo o DNA bacteriano extraído.

4.8.2.2. COLOCAÇÃO DAS AMOSTRAS NA MEMBRANA DE NYLON

Uma membrana de *nylon* (15 X 15cm) com carga positiva (Amersham Biosciences, Chicago, IL - USA) foi montada no *Minislot* 30® (Immunetics, Cambridge, MA - USA) (**FIG. 12**). Cada suspensão de amostra contendo DNA livre (**FIG 13-A**) foi depositada nas fendas do *Minislot* 30® (**FIG. 13-B**) e o DNA concentrado permaneceu

depositado na membrana de *nylon*. A membrana foi removida do aparato e o DNA, previamente depositado na mesma, foi fixado por intermédio de aquecimento em forno a 120°C, por 20 minutos. As duas últimas canaletas do *Minislot* 30® foram reservadas para a colocação dos controles, contendo uma mistura das espécies dos microrganismos que foram investigados pelas sondas de DNA, em duas concentrações, 10^5 e 10^6 células bacterianas.

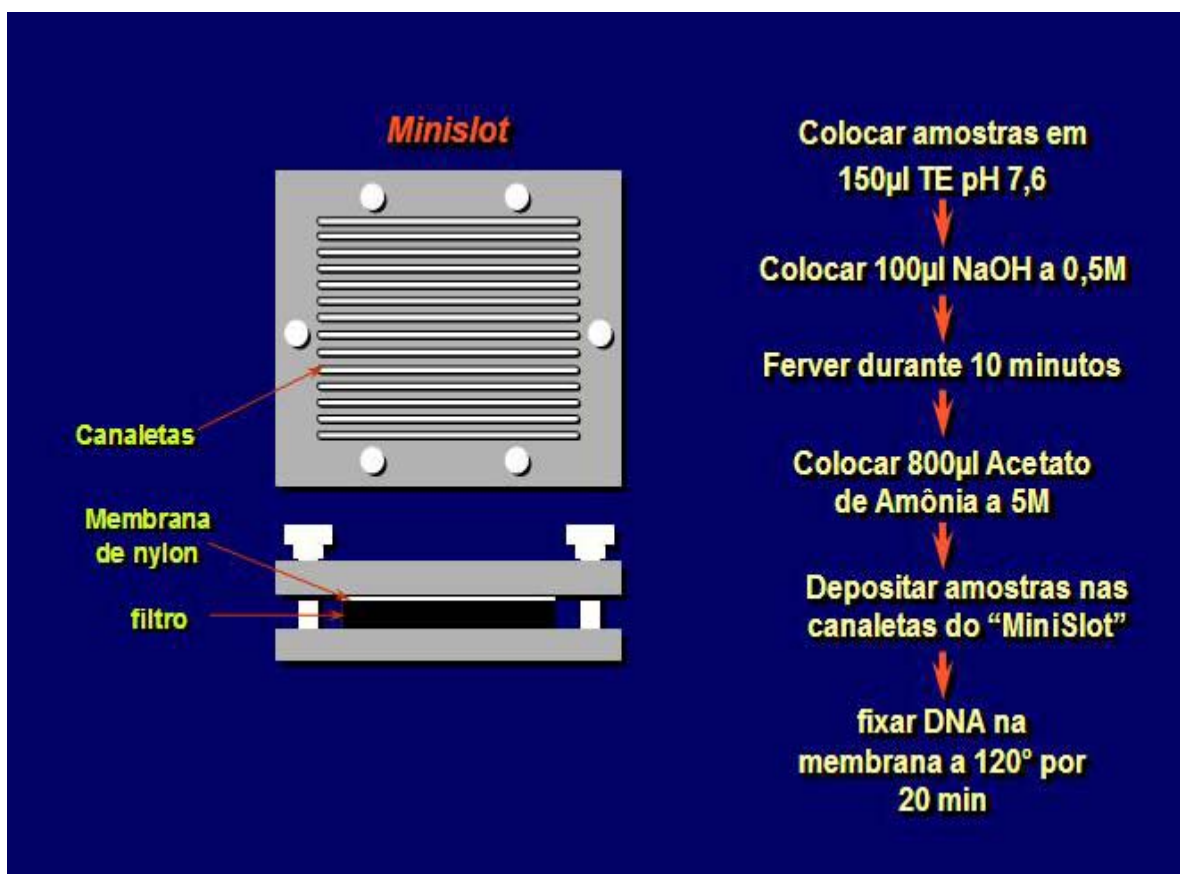


FIGURA 12- Representação gráfica do *Minislot* 30® e resumo da preparação e deposição das amostras nas canaletas do *Minislot* 30®, sobre a membrana de *nylon* (Técnica do *Checkerboard* DNA-DNA Hybridization).

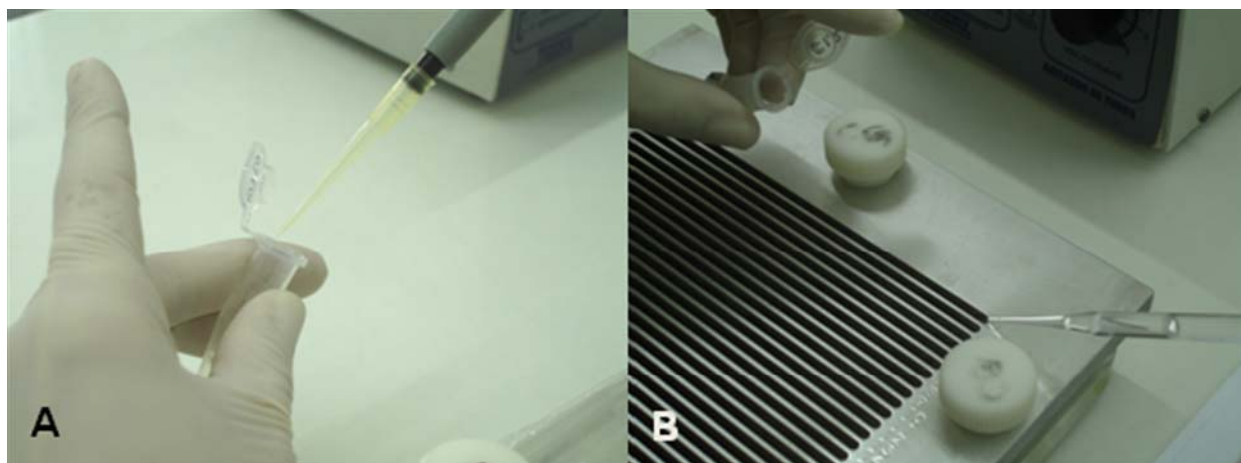


FIGURA 13- Colocação das amostras na membrana de *nylon*: **A-** Remoção de alíquota contendo suspensão do DNA microbiano; **B-** Deposição das amostras nas canaletas do *Minisolt 30®*, sobre a membrana de *nylon*.

4.8.2.3. HIBRIDIZAÇÃO DA MEMBRANA COM AS SONDAS DE DNA

Após a fixação do DNA na membrana, esta foi pré-hibridizada a 42°C, por uma hora, numa solução de 50% formamida, 1% caseína, 5 X SSC (Solução Salina Citratada), 25 mM de fosfato de sódio (pH 6,5) e 0,5 mg/mL de RNA de levedura. A membrana foi então colocada sob a placa acrílica do *Miniblotter 45®* (Immunetics, Cambridge, MA - USA) (**FIG. 14**), rotacionada a 90° de sua posição original, com as linhas contendo o DNA fixado, perpendiculares às canaletas do *Miniblotter 45®*. O *Miniblotter 45®* contém 45 canaletas que servem, cada uma, para a colocação de uma sonda de DNA.

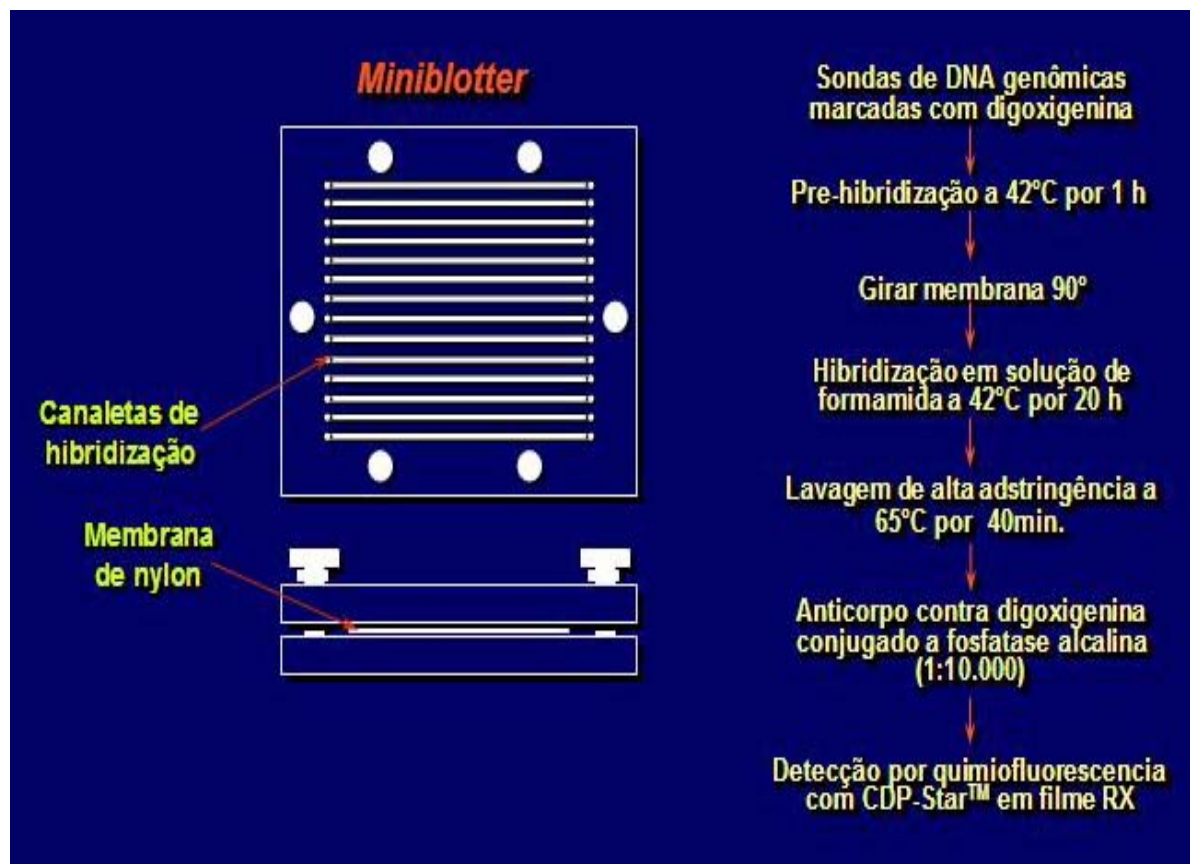


FIGURA 14- Representação gráfica do *Miniblotter 45®* e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas (Técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*).

As sondas de DNA específicas para as quarenta espécies que foram usadas nesse estudo (**TABELA 2**) foram confeccionadas usando o *random primer digoxigenin labeling Kit* (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN - USA), como descrito por Feinberg & Vogelstein (1983). Essas espécies foram selecionadas devido à sua associação às infecções endodônticas ou a sua presença em outras infecções orais e saliva (Gomes *et al.*, 1994a; Haffajee *et al.*, 1997; Socransky *et al.*, 1998; Jung *et al.*, 2000; Siqueira Jr. *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 2001; Siqueira Jr. *et al.*, 2001a; Siqueira Jr. & Rôças, 2003a; Gomes *et al.*, 2004; Soriano de Souza *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2005).

TABELA 2- Relação das cepas empregadas para o desenvolvimento das sondas de DNA bacteriano.

Espécies	Cepas (ATCC)
<i>Actinomyces gerencseriae</i> ^a	23860
<i>Actinomyces israelii</i> ^a	12102
<i>Actinomyces odontolyticus</i> ^a	17929
<i>Actinomyces viscosus</i> (naeslundii genospecies 2) ^a	43146
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans a e b</i> ^a	43718 e 29523
<i>Campylobacter gracilis</i> ^a	33236
<i>Campylobacter rectus</i> ^a	33238
<i>Campylobacter showae</i> ^a	51146
<i>Capnocytophaga gingivalis</i> ^a	33624
<i>Capnocytophaga ochracea</i> ^a	33596
<i>Capnocytophaga sputigena</i> ^a	33612
<i>Eikenella corrodens</i> ^a	23834
<i>Enterococcus faecalis</i> ^a	29212
<i>Eubacterium nodatum</i> ^a	33099
<i>Eubacterium saburreum</i> ^a	33271
<i>Fusobacterium nucleatum sp. nucleatum</i> ^a	25586
<i>Fusobacterium nucleatum sp. polymorphum</i> ^a	10953
<i>Fusobacterium nucleatum sp. vincentii</i> ^a	49256
<i>Fusobacterium periodonticum</i> ^a	33693
<i>Gemella morbillorum</i> ^a	27824
<i>Leptotrichia buccalis</i> ^a	14201
<i>Neisseria mucosa</i> ^a	19696
<i>Peptostreptococcus micros</i> (<i>Parvimonas micra</i>) ^a	33270
<i>Porphyromonas endodontalis</i> ^a	35406
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ^a	33277
<i>Prevotella intermedia</i> ^a	25611
<i>Prevotella melaninogenica</i> ^a	25845
<i>Prevotella nigrescens</i> ^a	33563
<i>Propionibacterium acnes I e II</i> ^a	11827 e 11828
<i>Selenomonas noxia</i> ^a	43541
<i>Streptococcus constellatus</i> ^a	27823
<i>Streptococcus gordonii</i> ^a	10558
<i>Streptococcus intermedius</i> ^a	27335
<i>Streptococcus mitis</i> ^a	49456
<i>Streptococcus oralis</i> ^a	35037
<i>Streptococcus sanguinis</i> ^a	10556
<i>Tannerella forsythia</i> ^a	43037
<i>Treponema denticola</i> ^b	B1
<i>Treponema socranskii</i> ^a	D40DR2
<i>Veillonella parvula</i> ^a	10790

Fonte das Cepas: ^aATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD – USA) e ^bFDC (Forsyth Dental Center, Forsyth, GA - USA).

Anteriormente ao seu uso, as sondas foram testadas com uma mistura controle contendo as espécies investigadas, numa concentração de 10^4 células bacterianas. Suas concentrações foram ajustadas de tal modo que a intensidade dos sinais de todas as sondas fossem semelhantes.

Cada sonda de DNA contida numa solução de hibridização (45% formamida, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0,2 mg/mL de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano, 1% caseína e 20 mg/mL de sonda de DNA). **(FIG 15-A)** foi removida com pipeta e colocada em canaleta do *Miniblotter* 45®. De modo que cada canaleta do *Miniblotter* 45® foi preenchida com 135 µL de uma determinada sonda **(FIG 15-B)**. As sondas hibridizaram perpendicularmente às linhas contendo o DNA bacteriano fixado, propiciando um formato de xadrez com as linhas de DNA, horizontais, e as sondas, verticais **(FIG. 16)**. O aparato, contendo o *Miniblotter* 45® e a membrana com as sondas e o DNA das amostras bacterianas fixado, foi colocado dentro de um saco plástico umedecido para evitar a desidratação das mesmas **(FIG. 17)** e incubado a 42°.para que a hibridização ocorresse.

A hibridização das membranas com as sondas ocorreu durante um período mínimo de 12 horas (*overnight*).

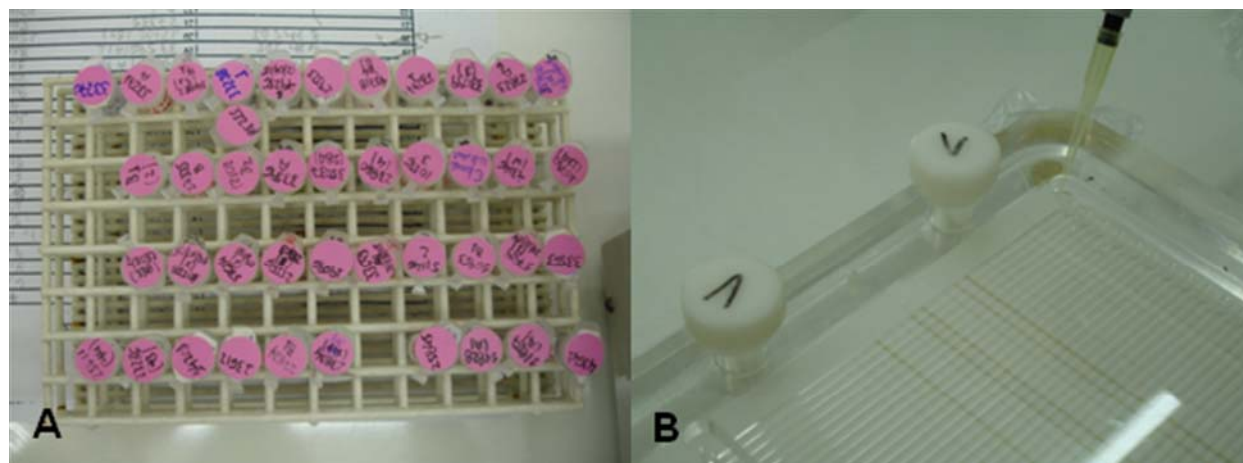


FIGURA 15- Hibridização das membranas com as sondas de DNA: **A-** Tubos tipo *Eppendorf* contendo as sondas de DNA; **B-** Colocação das sondas de DNA perpendicularmente às amostras já previamente fixadas, na membrana de *nylon*, no *Miniblotter 45®*.

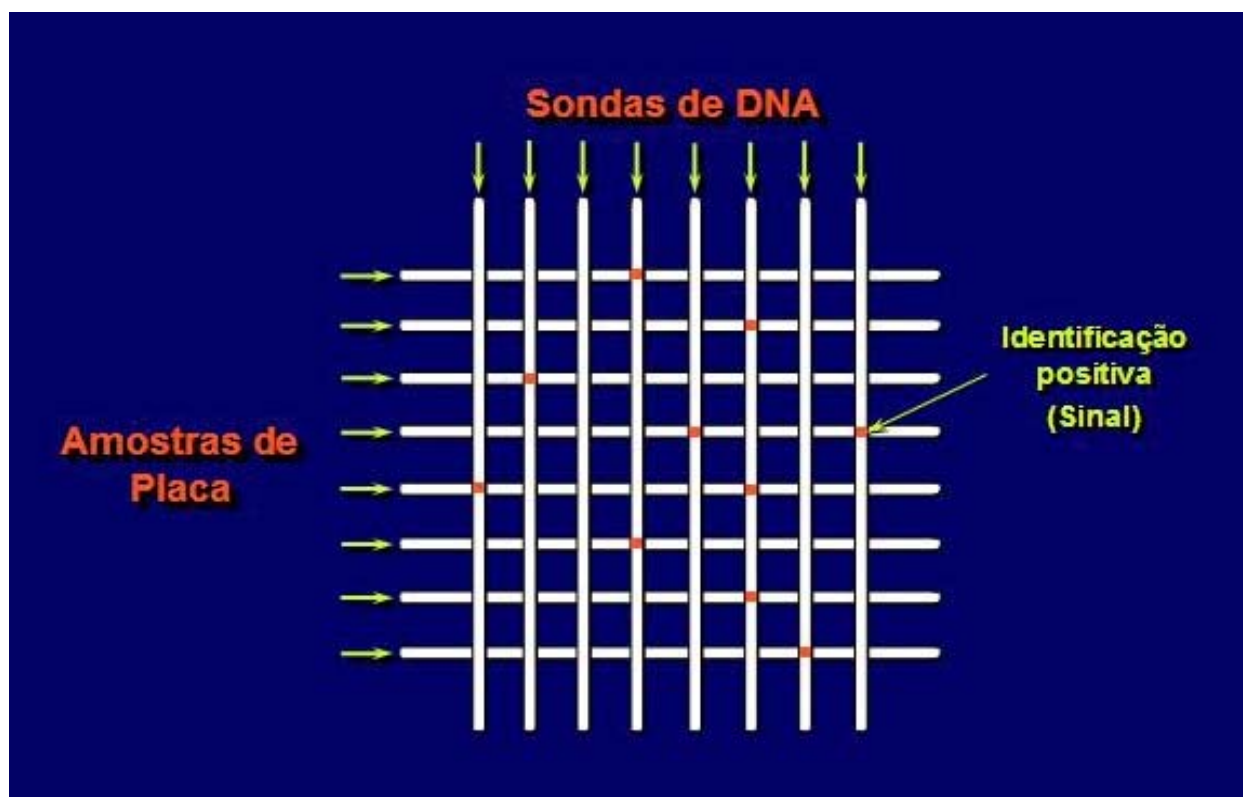


FIGURA 16- Representação gráfica do padrão das sondas de DNA com as bactérias presentes nas amostras dos canais radiculares em forma de tabuleiro de xadrez (Técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*).

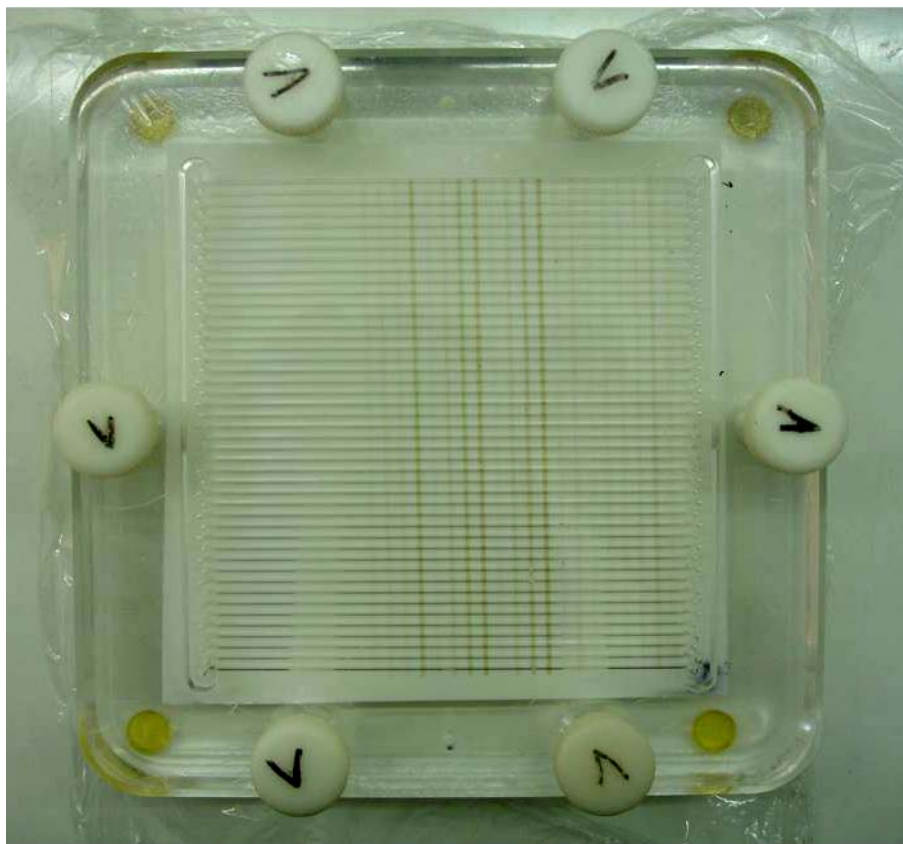


FIGURA 17- Aspecto do aparato, contendo o *Miniblotter 45®* e a membrana com as sondas e o DNA das amostras bacterianas fixado, colocado em saco plástico umedecido.

4.8.2.4. DETECÇÃO DAS ESPÉCIES

Após a hibridização com a sonda, as membranas foram removidas do *Miniblotter 45®* e lavadas por 40 minutos a 65°C, numa solução adstringente de PO_4 *Buffer* (tampão de fosfato), a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, as membranas foram imersas por 1 hora, sob agitação, numa solução bloqueadora contendo 0,1 M ácido maleico, 3 M NaCl, 0,2 M NaOH, 0,3% Tween 20, 0,5% caseína, pH 8,0 e por 30 minutos na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina (*Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments* – Roche Diagnostics GmbH, Mannheim – Germany) conjugado à fosfatase alcalina (Boehringer, Mannheim -

Germany), numa diluição de 1/25.000⁸. As membranas foram, então, lavadas com uma solução de 0,1 M ácido maleico, 3 M NaCl, 0,2 M NaOH, 0,3% Tween 20, pH 8,0, duas vezes por 20 minutos, e uma vez por 5 minutos em 0,1 M Tris HCl, 0,1 NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9,5. Em seguida, as membranas foram incubadas em uma solução detectora, *CDP-Star Detection Reagent*® (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire - UK), por 60 minutos a 37°C. Finalmente, as membranas foram colocadas num cassete sob um filme radiográfico (Kodak® X-OMAT Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda, São José dos Campos, SP) por aproximadamente 40 minutos, e os filmes revelados logo em seguida.

Cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra dos canais radiculares foi comparado em intensidade ao sinal produzido pela mesma sonda nos dois controles contendo 10⁵ e 10⁶ (**FIG. 18**). Assim sendo, o número (0) era registrado quando não havia detecção do sinal; (1) equivalia a um sinal menos intenso que o controle de 10⁵ células; (2) a aproximadamente 10⁵ células; (3) entre 10⁵ e 10⁶ células; e (5) a mais que 10⁶ células (**TABELA 3**).

Esses registros foram então utilizados para determinar os diferentes níveis das espécies investigadas em cada amostra. Além disso, foram feitos registros quanto apenas a presença (>0) ou ausência (0) de cada espécie por amostra.

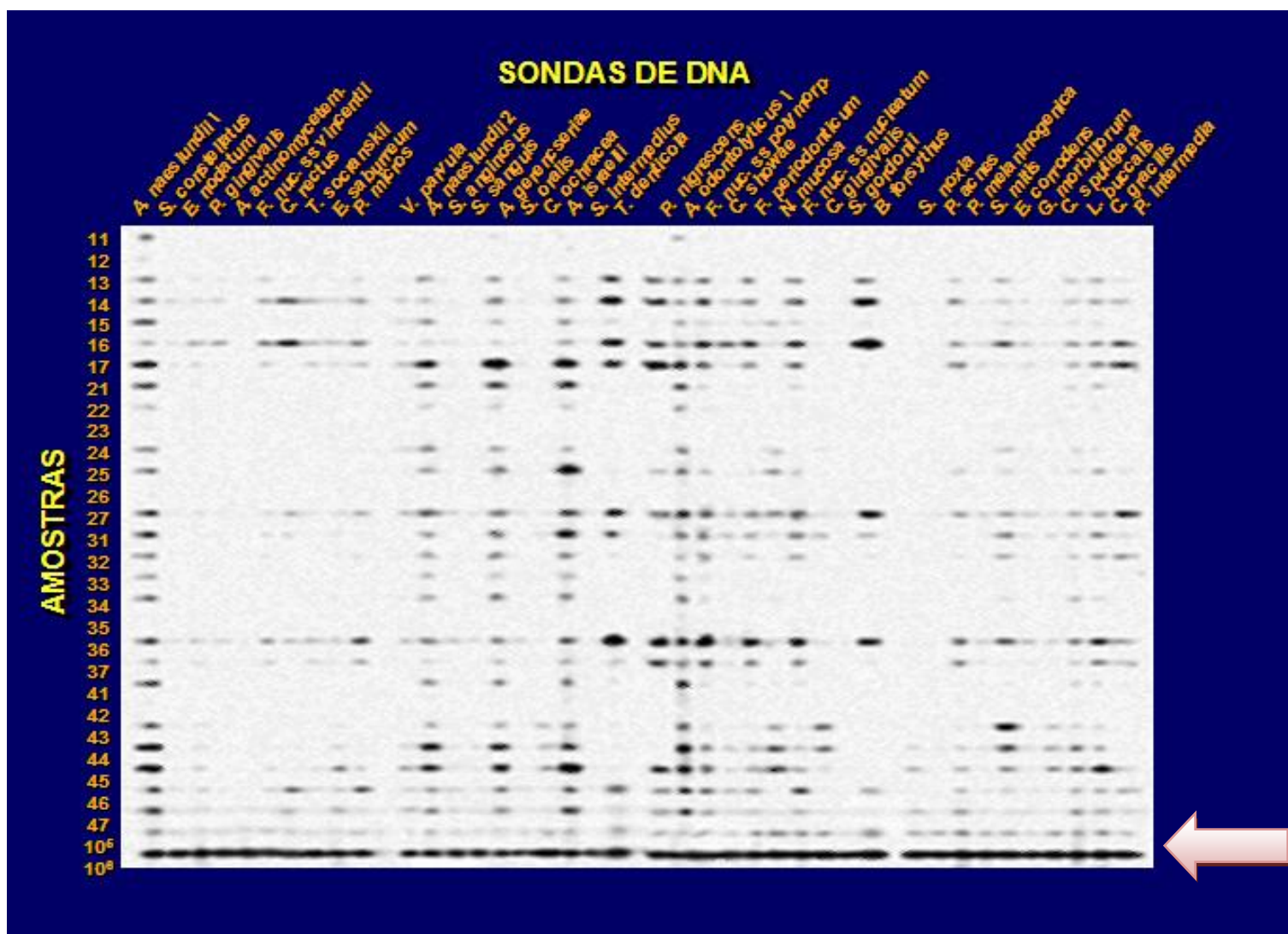


FIGURA 18- Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de canais radiculares e as sondas de DNA (Técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*), com destaque dos controles, nas últimas duas linhas, assinaladas por seta.

TABELA 3- Índice utilizado para determinação a quantidade de células microbianas nas amostras dos canais radiculares e seus valores numéricos correspondentes.

Índice	Quantidade de Células	Valor Numérico
0	Não detectado	0
1	Menos de 10^5	10.000
2	Aproximadamente 10^5	100.000
3	Entre 10^5 e 10^6	500.000
4	Aproximadamente 10^6	1.000.000
5	Mais de 10^6	10.000.000

4.9. ANÁLISE DOS DADOS

A análise dos dados incluiu quarenta e duas amostras bacterianas provenientes de vinte e um canais radiculares coletados antes e após o preparo químico-mecânico.

Com referência aos aspectos radiográficos e microbiológicos dos dentes estudados, os dados coletados foram introduzidos numa planilha de cálculo e estatisticamente analisados usando SPSS for Windows (SPSS I45 canc., Chicago, Illinois - EUA). O teste de *Pearson Chi-square* ou o *Fisher's Exact test*, quando apropriado, foi escolhido para testar a hipótese nula de que não existe correlação entre os aspectos clínico-radiográficos das lesões periapicais induzidas e os aspectos microbiológicos estudados.

Para testar a mudança na microbiota das diferentes coletas (C1 e C2, antes e após o preparo químico-mecânico) foi utilizado o teste de *McNemar*.

Todas as análises de correlação estatística foram realizadas ao nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Nas análises de prevalência de microorganismos detectados pela Técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foram consideradas ausência (0) ou presença (>0) do microorganismo. Os níveis das diferentes espécies foram determinados utilizando-se a média das frequências dos registros 0-5 em cada amostra (**TABELA 3**).

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE CLÍNICA E RADIOGRÁFICA DAS LESÕES PERIAPICAIS INDUZIDAS

5.1.1 ANÁLISE CLÍNICA

Foram procedidos exames clínicos, com sondagem periodontal e avaliações radiográficas aos 15, 30, 60 e 90 dias. Não houve evidência de edema, trajeto fistuloso ou alterações periodontais associados a qualquer dos dentes envolvidos neste estudo. Foi observada grande quantidade de detritos que preenchia a câmara pulpar, porém não houve presença de fraturas no tempo deste experimento, com exceção de um dente, onde se observou uma pequena fratura coronária.

Dos 21 dentes inferiores estudados, sete foram segundos pré-molares (P_2), sete terceiros pré-molares (P_3), e sete quartos pré-molares (P_4).

O comprimento real de trabalho (CRT) dos dentes variou entre 10 e 14 mm (**APÊNDICE 3**). Os P_2 apresentaram média de CRT de 9,89 mm, os P_3 de 10,86 mm e os P_4 apresentaram as maiores médias de CRT, 13,36 mm (**FIG. 19**).

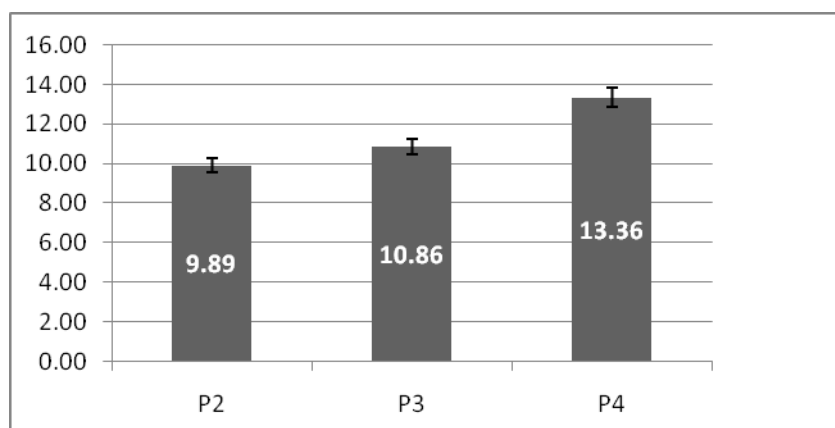


FIGURA 19– Média e desvio padrão do comprimento real de trabalho (CRT) dos elementos dentais analisados.

5.1.2 ANÁLISE RADIOGRÁFICA DAS LESÕES PERIAPICAIS

Na análise radiográfica, observou-se indução de lesões periapicais em todos os dentes estudados no período de 120 dias.

A média das áreas das imagens radiográficas foi de $0,12 \text{ cm}^2$, sendo $0,06$ para P_2 ; $0,12 \text{ cm}^2$ para P_3 e $0,18 \text{ cm}^2$ para P_4 (**FIG. 20**).

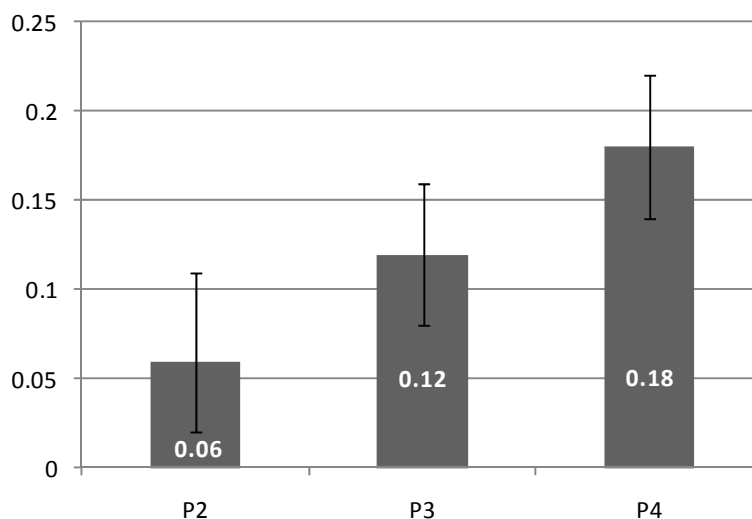


FIGURA 20— Média e desvio padrão das áreas das lesões periapicais induzidas associadas aos elementos dentais analisados.

A média dos perímetros das lesões periapicais induzidas foi de $2,47$, sendo $1,47$ mm para os P_2 , $2,07$ mm para os P_3 e $2,45$ mm para os P_4 (**FIG. 21**).

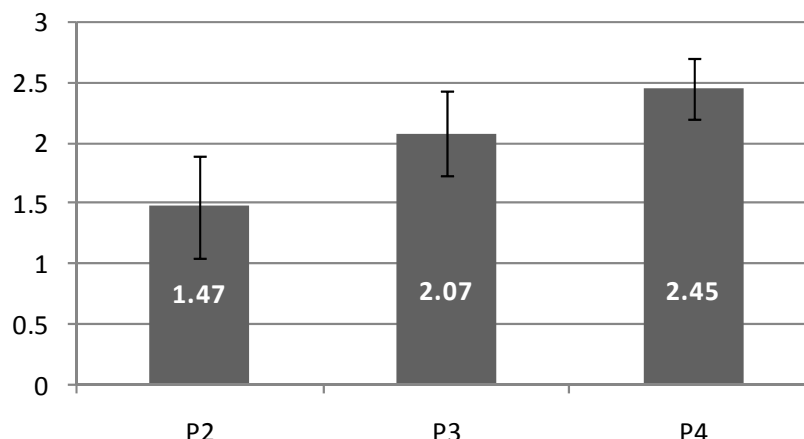


FIGURA 21– Médias e desvio padrão dos perímetros das lesões periapicais induzidas associadas aos elementos dentais analisados.

A análise estatística dos dados demonstrou associação entre os dentes de menor CRT e as menores áreas de imagem radiográfica de lesão periapical ($p=0,001$, $IC=4.141-1.469.186$). Da mesma forma, houve associação entre os dentes de maior CRT e as maiores áreas de imagem radiográfica de lesão periapical ($p=0,025$; $IC=1.387-216.602$).

5.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DOS CANAIS RADICULARES PELA TÉCNICA DA CULTURA

5.2.1 COLETA INICIAL (C1)

Foram isoladas 60 bactérias cultiváveis, as quais pertenciam a 14 diferentes gêneros e 32 diferentes espécies (**TABELA 4**). As espécies microbianas isoladas de cada dente podem ser visualizadas no **APÊNDICE 4**.

TABELA 4- Morfologia, coloração de Gram e freqüência dos microrganismos isolados de 21 canais radiculares de dentes de cão, nas coletas iniciais (C1).

Espécie	Morfologia	Gram	Requerimento Gasoso	Nº	%
<i>Neisseria</i> spp	Coco	Negativo	Facultativo	7	11.67
<i>Não identificados</i>	-	-	-	5	8.33
<i>Streptococcus bovis I</i>	Coco	Positivo	Facultativo	4	6.67
<i>Propionibacterium acnes</i>	Coco	Positivo	Estrito	4	6.67
<i>Prevotella oralis</i>	Bacilo	Negativo	Estrito	4	6.67
<i>Staphylococcus intermedius</i>	Coco	Positivo	Facultativo	3	5.00
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Bacilo	Positivo	Estrito	3	5.00
<i>Streptococcus salivarius</i>	Coco	Positivo	Facultativo	2	3.33
<i>Streptococcus bovis II</i>	Coco	Positivo	Facultativo	2	3.33
<i>Staphylococcus aureus</i>	Coco	Positivo	Facultativo	2	3.33
<i>Propionibacterium propionicum</i>	Coco	Positivo	Estrito	2	3.33
<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	Coco	Positivo	Facultativo	2	3.33
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	Bacilo	Positivo	Estrito	2	3.33
<i>Streptococcus suis II</i>	Coco	Positivo	Facultativo	1	1.67
<i>Streptococcus suis</i>	Coco	Positivo	Facultativo	1	1.67
<i>Streptococcus</i> spp	Coco	Positivo	Facultativo	1	1.67
<i>Staphylococcus xylosus</i>	Coco	Positivo	Facultativo	1	1.67
<i>Staphylococcus lentus</i>	Coco	Positivo	Facultativo	1	1.67
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Coco	Positivo	Facultativo	1	1.67
<i>Staphylococcus capitis</i>	Coco	Positivo	Facultativo	1	1.67
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Bacilo	Negativo	Estrito	1	1.67
<i>Peptostreptococcus</i> spp	Coco	Positivo	Estrito	1	1.67
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	Coco	Positivo	Estrito	1	1.67
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Bacilo	Positivo	Facultativo	1	1.67
<i>Enterococcus avium</i>	Coco	Positivo	Estrito	1	1.67
<i>Clostridium tyrobutiricum</i>	Bacilo	Positivo	Estrito	1	1.67
<i>Clostridium clostridiforme</i>	Bacilo	Positivo	Estrito	1	1.67
<i>Aerococcus viridans 3</i>	Coco	Positivo	Facultativo	1	1.67
<i>Actinomyces naeslundii</i>	Bacilo	Positivo	Facultativo	1	1.67
<i>Actinomyces israelii</i>	Bacilo	Positivo	Facultativo	1	1.67
<i>Abiotrophia adiascens</i>	Coco	Positivo	Facultativo	1	1.67

O crescimento bacteriano foi verificado em 17 dos 21 dentes envolvidos nesta pesquisa, com o número de espécies por canal variando de 0 a 9 (**FIG. 22**). Os dentes com as maiores médias de CRT, P₄, apresentaram crescimento microbiano em 100% dos casos.

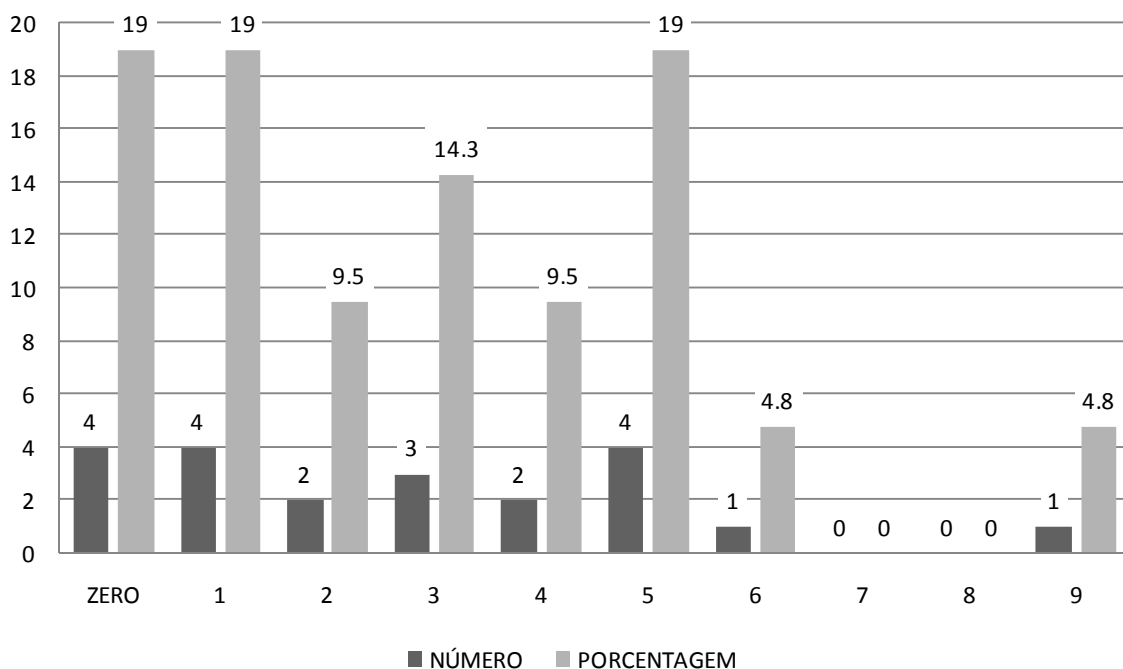


FIGURA 22– Distribuição de microrganismos, por canal radicular, em 21 dentes de cães com lesão periapical induzida, isolados através do Método de Cultura microbiana, na coleta inicial (C1).

Do total de bactérias isoladas, 70% eram anaeróbios facultativos, sendo estes encontrados em canais radiculares de 14 dentes. Por sua vez, anaeróbios estritos foram isolados de 8 dentes, correspondendo a 18% do total de bactérias. Os canais radiculares apresentaram uma microbiota predominantemente Gram-positiva, num total de 44 cepas, correspondendo a 73% dos isolados (**FIG. 23**).

Não foram isolados fungos dos canais radiculares investigados.

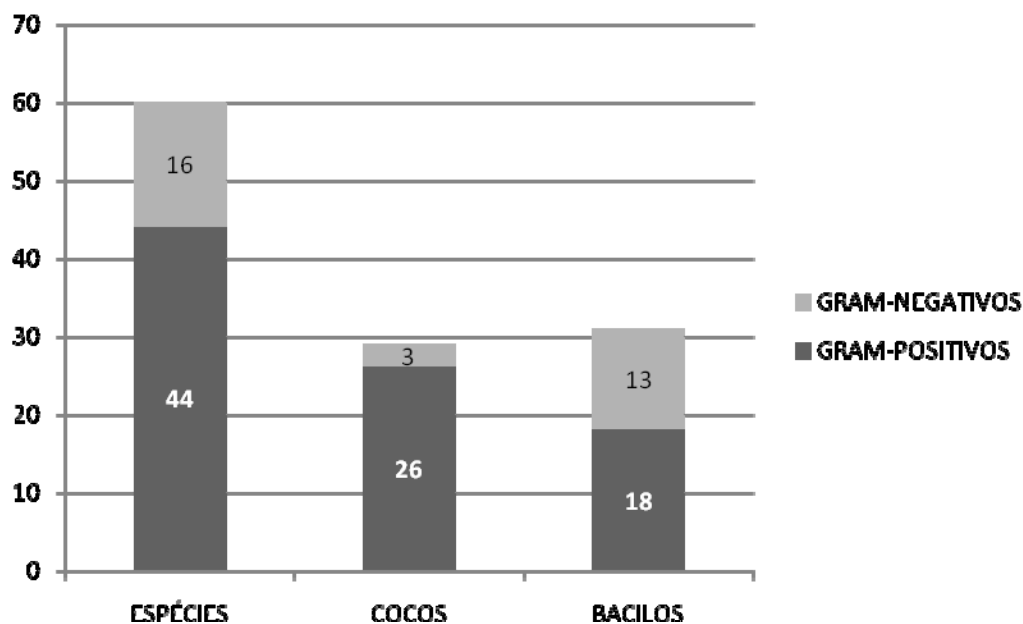


FIGURA 23– Frequência de espécies Gram-positivas e Gram-negativas e distribuição dos tipos morfológicos quanto à coloração de Gram em canais de cães, isoladas através do Método de Cultura microbiana, na coleta inicial (C1) (n=60).

Na análise dos aspectos radiográficos e microbiológicos, não houve associação estatisticamente significativa entre estes dois aspectos. Quanto à relação existente entre área da lesão e número de espécies microbianas isoladas por coleta, observou-se que quanto maior a área da lesão, maior o número de espécies microbianas isoladas, de tal forma que os dentes com maiores médias das áreas das lesões periapicais (P_3 e P_4) apresentavam frequentemente infecções com 4 ou mais microrganismos (**APÊNDICE 4**).

Os anaeróbios facultativos mais frequentemente isolados dos canais radiculares foram: *Neisseria* spp (7/21) e *Streptococcus bovis* I (4/21). *Propionibacterium. acnes* (4/21).e *Prevotella oralis* (4/21) foram as espécies anaerobias estritas mais isoladas.

Os gêneros bacterianos mais frequentemente isolados estão relacionados na **FIGURA 24**.

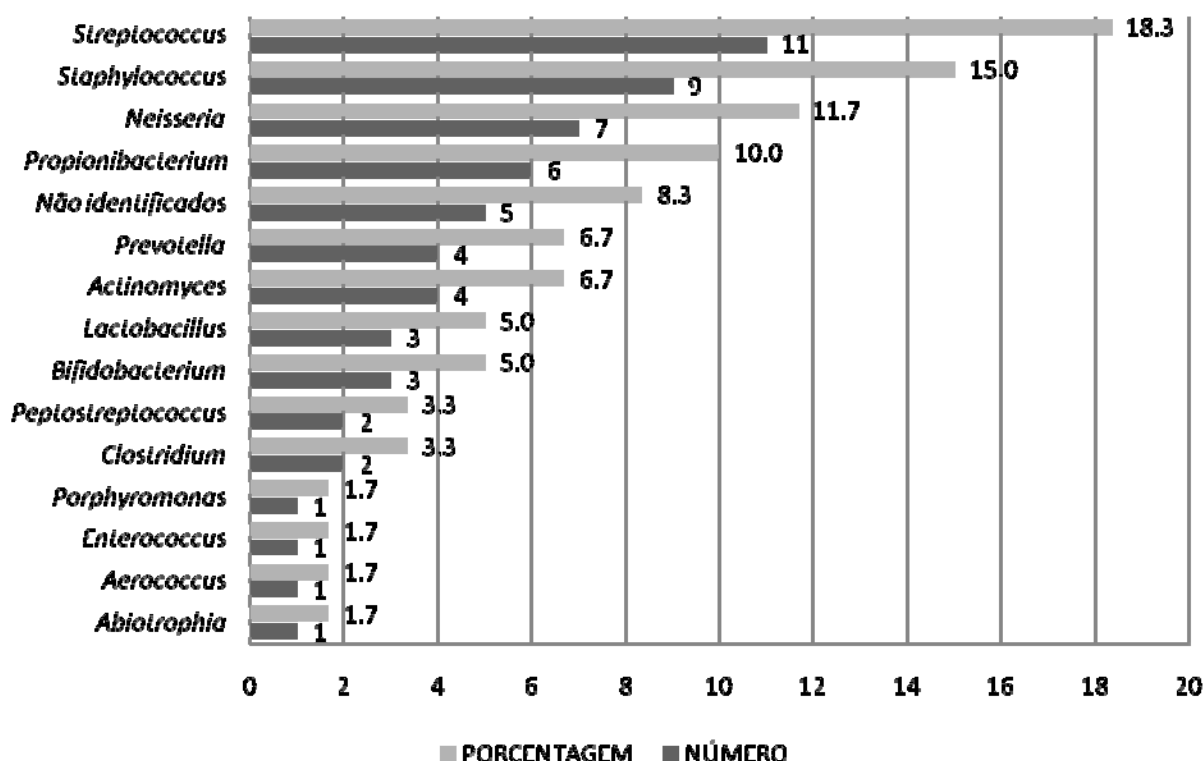


FIGURA 24- Prevalência dos gêneros bacterianos em 21 canais de dentes de cães com lesão periapical induzida, isolados através do Método de Cultura microbiana, na coleta inicial (C1).

Foram observadas correlações estatisticamente significantes entre as espécies *Prevotella oralis* e *Propionibacterium propionicum* ($p=0.029$; $IC=0.751-5.329$); *Prevotella oralis* e *Streptococcus bovis* 2 ($p=0.029$; $IC=0.751-5.329$); e, *Streptococcus bovis* 1 e *Streptococcus bovis* 2 ($p=0.029$; $IC=0.751-5.329$).

5.2.2 COLETA APÓS O PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO (C2)

Independente da substância química empregada, após o preparo químico-mecânico (C2) todos os canais radiculares apresentaram ausência de crescimento microbiano na cultura.

5.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DOS CANAIS RADICULARES PELA TÉCNICA DO *CHECKERBOARD* DNA-DNA *HYBRIDIZATION*

5.3.1 COLETA INICIAL (C1)

Nas coletas iniciais (1), pela Técnica do *Checkerboard* DNA-DNA *Hybridization*, foram detectadas 158 bactérias, as quais pertenciam a 18 diferentes gêneros e 29 diferentes espécies (**FIG. 25**). As espécies microbianas detectadas em cada dente podem ser visualizadas no (**APÊNDICE 5**).

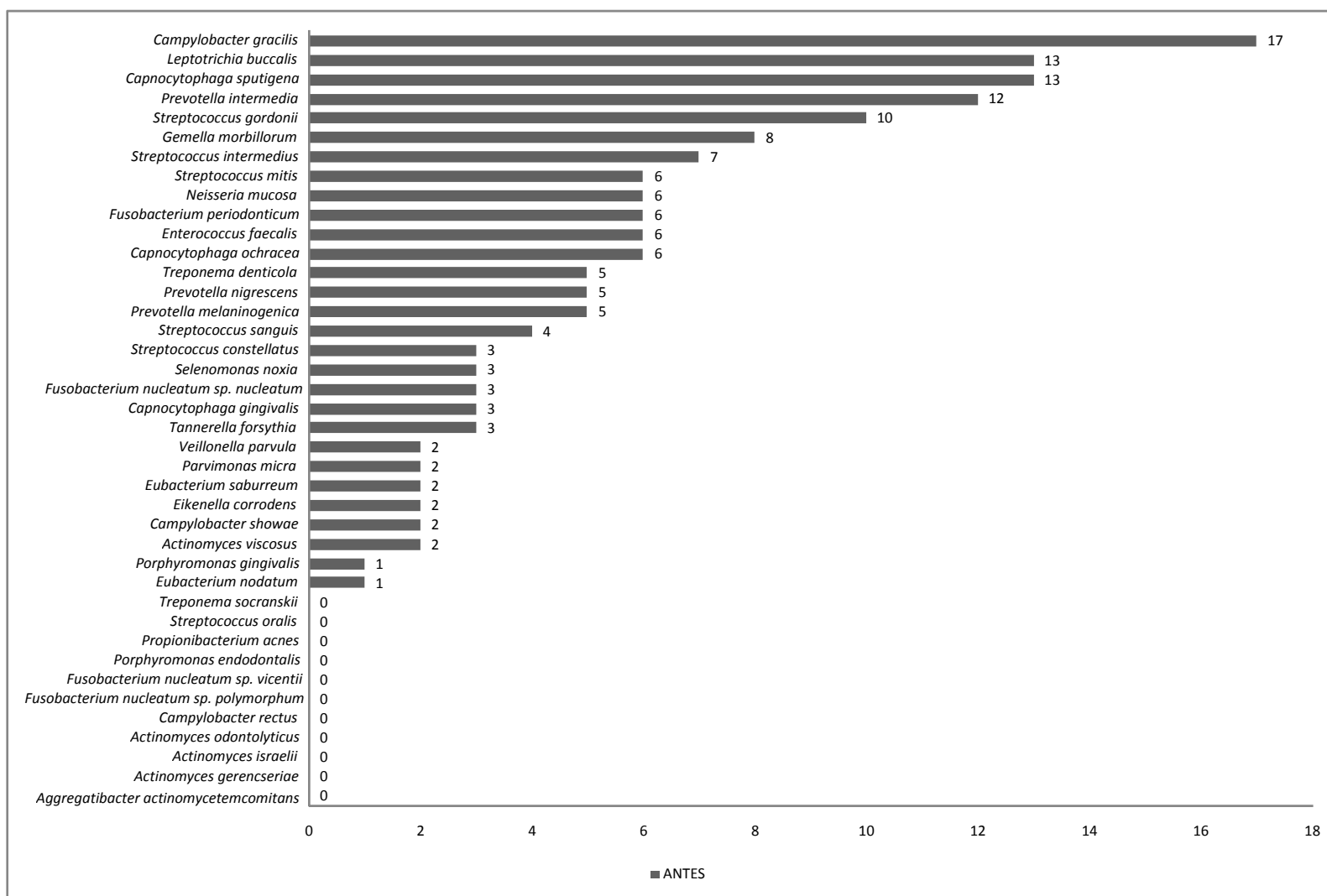


FIGURA 25- Prevalência dos gêneros bacterianos em 21 canais de dentes de cães com lesão periapical induzida, detectados através do método de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, nas coletas iniciais (C1).

As espécies bacterianas avaliadas foram detectadas em 19 das 21 amostras desta pesquisa, com o número de espécies variando de 0 a 19 (**FIG. 26**).

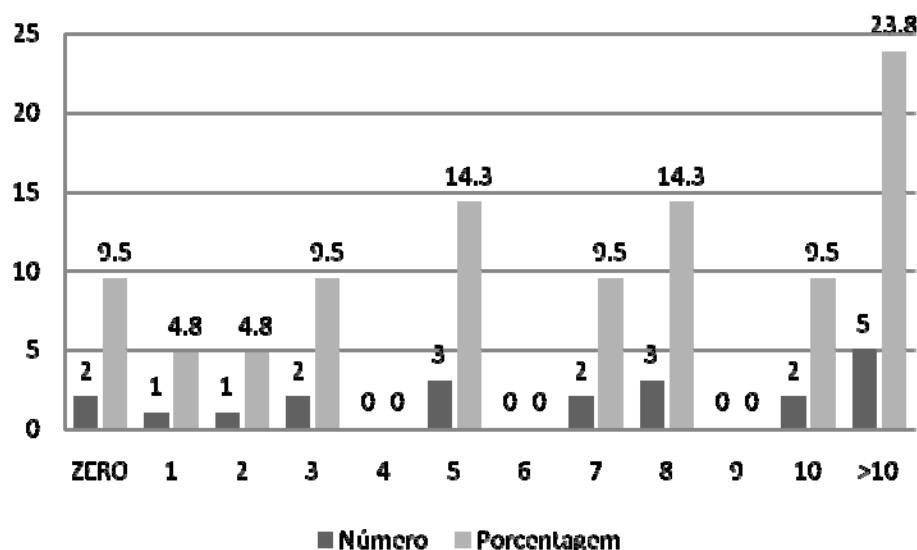


FIGURA 26– Distribuição de microrganismos, por canal radicular, em 21 dentes de cães com lesão periapical induzida, detectados através do método de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, nas coletas iniciais (C1).

Do total de bactérias detectadas na C1, 67% foram anaeróbios estritos, sendo encontrados em canais radiculares de 19 dentes. Por sua vez, anaeróbios facultativos foram detectados em 15 dentes, correspondendo a 33% do total de bactérias. Os canais radiculares apresentaram uma microbiota predominantemente Gram-negativa, num total de 106 cepas, correspondendo a 67% dos isolados (**FIG. 27**).

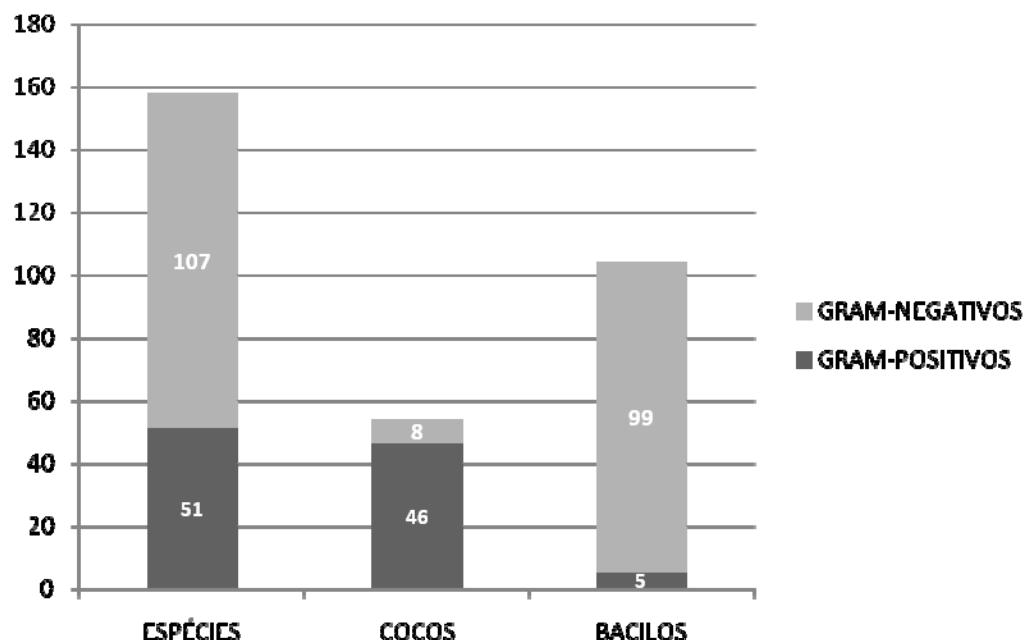


FIGURA 27– Frequência de espécies Gram-positivas e Gram-negativas e distribuição dos tipos morfológicos quanto à coloração de Gram em 21 canais de cães, detectadas através do método de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, nas coletas iniciais (C1) (n=158).

Na análise entre os aspectos radiográficos e os aspectos microbiológicos, não houve associação estatisticamente significativa.

Os microrganismos mais freqüentemente detectados nos canais radiculares em C1, foram: *Campylobacter gracillis* (17/21), *Capnocytophaga sputigena* (13/21), *Leptotrichia bucallis* (13/21), *Prevotella intermedia* (12/21), *Streptococcus gordonii* (10/21) e *Gemella morbilorum* (8/21).

Os gêneros bacterianos mais frequentemente detectados em C1 estão relacionados na **FIGURA 28**.

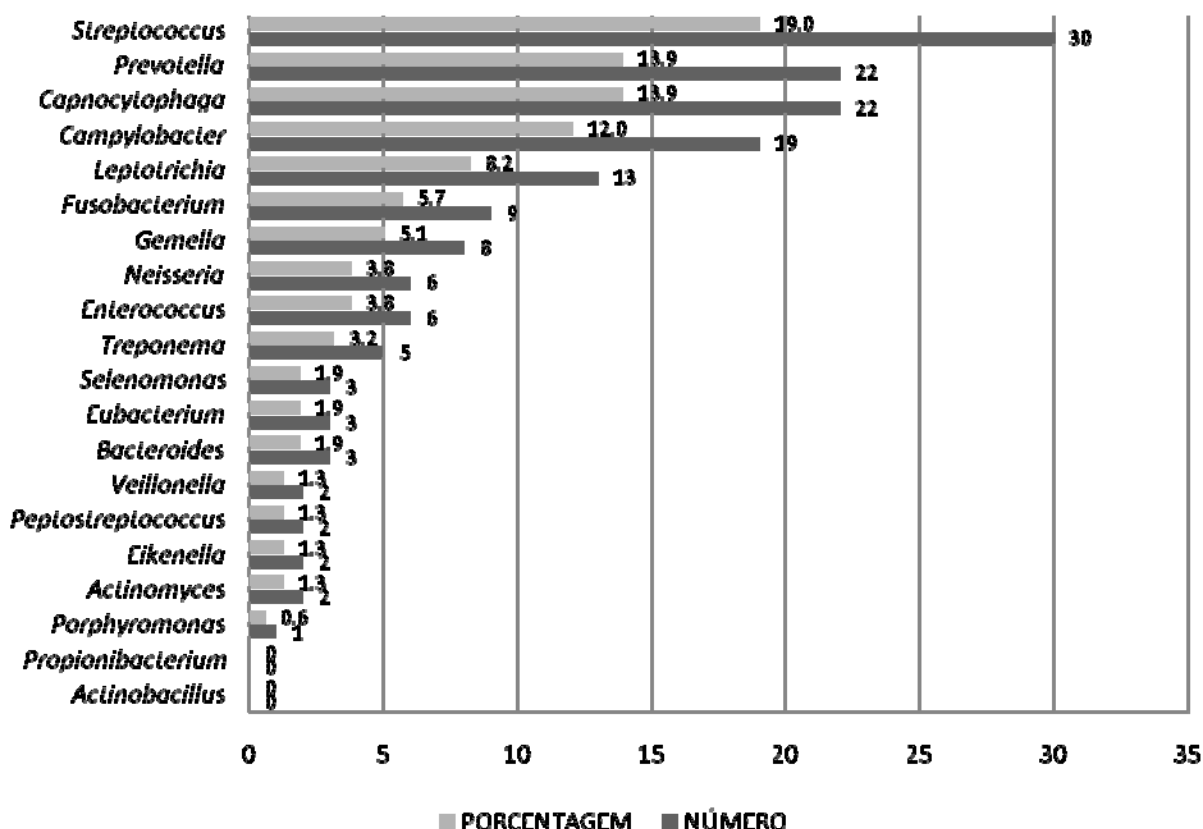


FIGURA 28- Prevalência dos gêneros bacterianos em 21 canais de dentes de cães com lesão periapical induzida, detectados através do método de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, na coleta inicial (C1).

Foram observadas correlações estatisticamente significantes entre as espécies *Capnocytophaga ochracea* e *Enterococcus faecalis* ($p=0.02$; IC=3.649-1.342.660); *Capnocytophaga sputigena* e *Leptotrichia buccalis* ($p=0.018$; IC=1832-148.606); *Capnocytophaga sputigena* e *Prevotella intermedia* ($p=0.002$; IC=2915-508463); *Gemella morbillorum* e *Prevotella melaninogenica* ($p=0.047$; IC=1019-141336); e *Leptotrichia buccalis* e *Prevotella intermedia* ($p=0.032$; IC=1280-78117).

Além disso, a presença de Gram-positivos esteve associada à detecção de *Leptotrichia buccalis* ($p=0.047$; IC=1019-141336).

5.3.2 COLETA APÓS O PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO (C2)

Após o preparo químico-mecânico (C2), pela Técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, foram detectadas 33 bactérias, as quais pertenciam a 9 diferentes gêneros e 11 diferentes espécies (**FIG. 29**).

As espécies microbianas detectadas em cada dente podem ser visualizadas no (**APÊNDICE 6**).

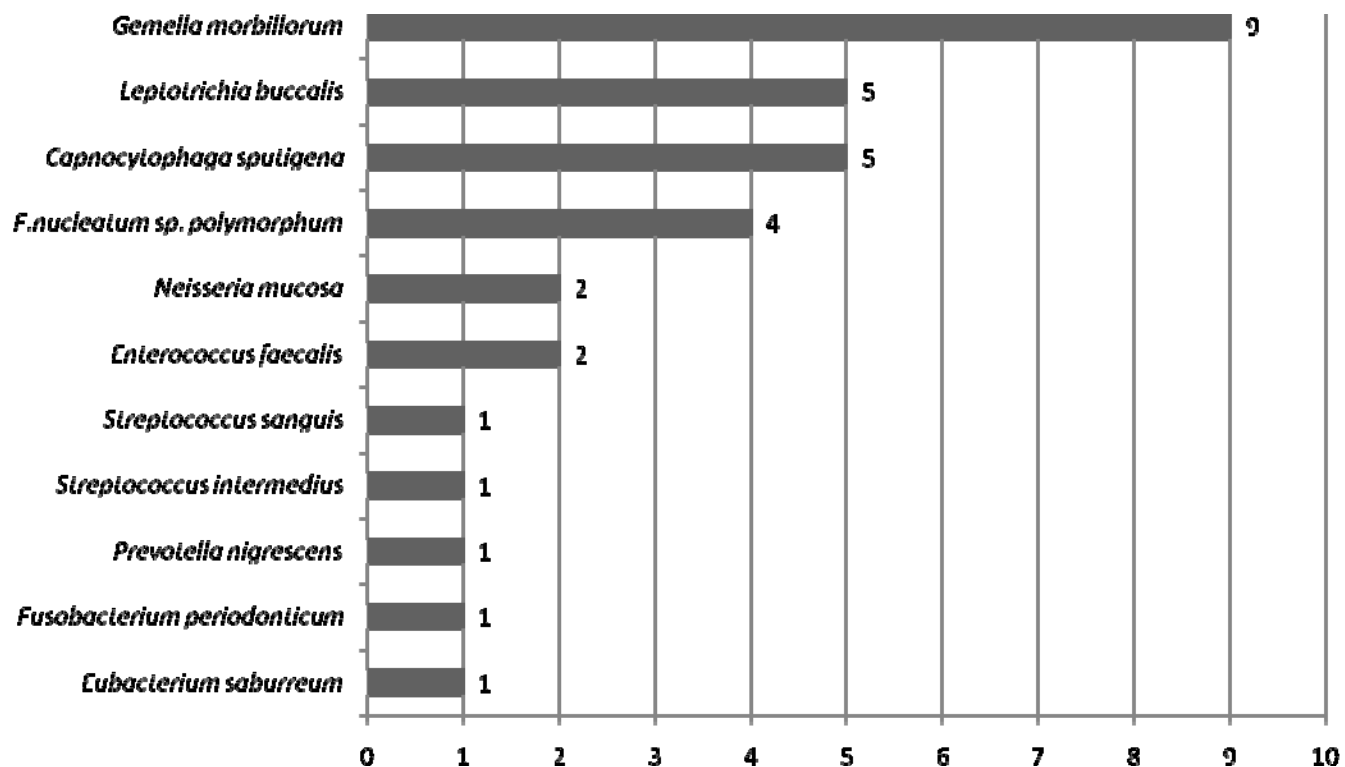


FIGURA 29- Prevalência das espécies bacterianas em 21 canais de dentes de cães com lesão periapical induzida, detectados através do método de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, após o preparo químico-mecânico (C2).

As espécies bacterianas avaliadas após o preparo químico-mecânico (C2) foram detectadas em 10 das 21 amostras, com o número de espécies variando de 0 a 8, com prevalência de detecção negativa para as espécies selecionadas (47,6%) (**FIG. 30**).

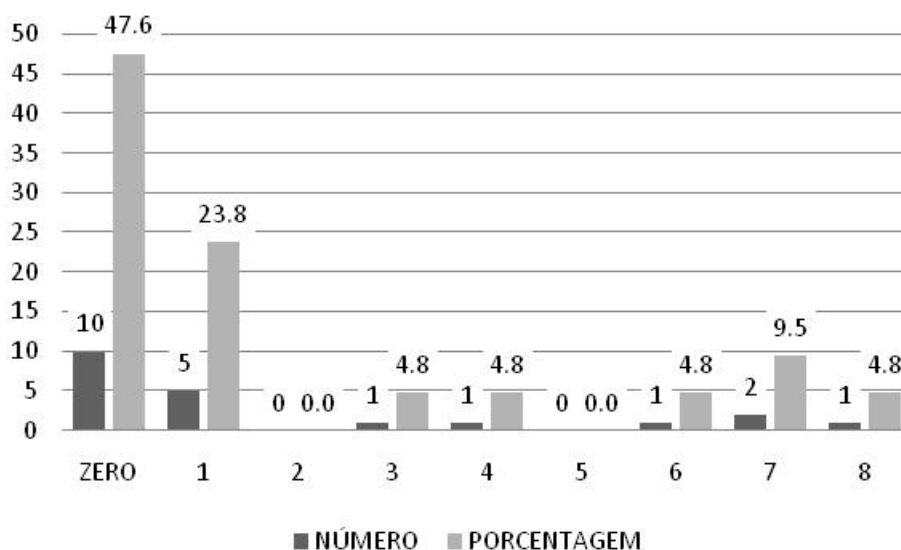


FIGURA 30– Distribuição de microrganismos por canal radicular, em 21 dentes de cães com lesão periapical induzida, detectados através do método de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, após preparo químico-mecânico (C2).

Do total de bactérias detectadas, 55% foram anaeróbias estritas, sendo encontradas em canais radiculares de 5 dentes. Por sua vez, anaeróbias facultativas foram detectadas em 10 dentes, correspondendo a 45% do total de bactérias. Os canais radiculares apresentaram uma microbiota predominantemente Gram-negativa, num total de 19 cepas, correspondendo a 58% dos microrganismos detectados (**FIG. 31**).

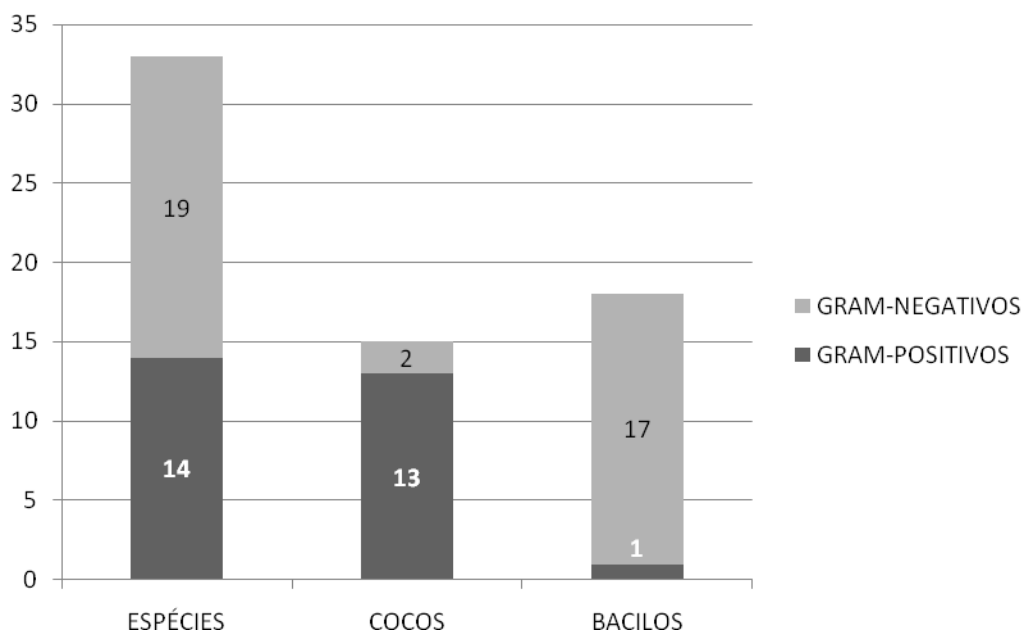


FIGURA 31– Frequência de espécies Gram-positivas e Gram-negativas e distribuição dos tipos morfológicos quanto à coloração de Gram em canais de cães, detectadas através do método de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, após o preparo químico-mecânico (C2) (n=33).

Os microrganismos mais freqüentemente detectados nos canais radiculares após o preparo químico-mecânico (C2) foram: *Gemella morbilorum* (9/21), *Capnocytophaga sputigena* (5/21), *Leptotrichia bucallis* (5/21) *Fusobacterium nucleatum* sp. *polymorphum* (4/21) e *Enterococcus faecalis* (2/21).

Os gêneros bacterianos mais frequentemente detectados após o preparo químico-mecânico (C2) estão relacionados na **FIGURA 32**.

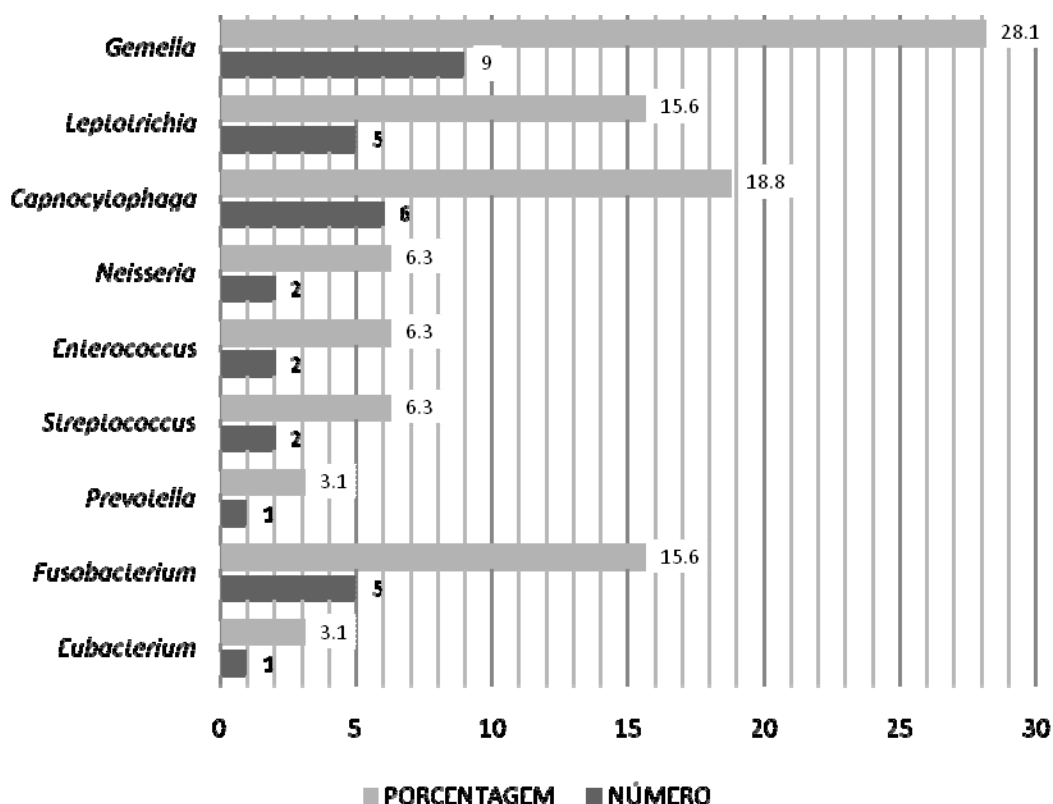


FIGURA 32- Prevalência dos gêneros bacterianos detectados em 21 canais de dentes de cães com lesão periapical induzida, após preparo químico-mecânico (C2).

Não foram observadas correlações estatisticamente significantes entre as espécies após o preparo mecânico (C2).

5.3.3 ANÁLISE COMPARATIVA DA DETECÇÃO DE ESPÉCIES ANTES (C1) E APÓS O PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO (C2) DOS CANAIS RADICULARES

Os dados da detecção de espécies, antes (C1) e após a utilização das diferentes substâncias avaliadas no preparo químico-mecânico (C2) dos canais radiculares, foram analisados observando-se dois aspectos para a análise comparativa: o número de espécies e a quantidade de células.

5.3.3.1 ANÁLISE QUANTO AO NÚMERO DE ESPÉCIES

A **TABELA 5** demonstra o número e percentual de espécies microbianas, antes (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2), independente da substância química auxiliar empregada, detectadas pela Técnica do *Checkerboard* DNA-DNA *Hibridization*.

Observou-se que as espécies *Gemella morbillorum* (5,06% em C1 e 28,13% em C2), *Capnocytophaga sputigena* (8,23% em C1 e 15,63% em C2), *Leptotrichia buccalis* (8,23% em C1 e 15,63% em C2) e *Fusobacterium nucleatum* sp. *polymorphum* (0% em C1 e 12,5% em C2) foram detectadas com maior frequência após os procedimentos de desinfecção (C2).

A espécie *Fusobacterium nucleatum* sp *polymorphum* não foi detectada nas amostras iniciais (C1) avaliadas. No entanto, foi observada após o preparo químico-mecânico (C2), independente da substância empregada.

TABELA 5– Número e percentual de espécies bacterianas, detectadas antes (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2) (*Checkerboard DNA-DNA Hybridization*).

Espécie	Nº C1	%	Nº C2	%
<i>Campylobacter gracilis</i>	17	10.76	0	0
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	13	8.23	5	15,63
<i>Leptotrichia buccalis</i>	13	8.23	5	15,63
<i>Prevotella intermedia</i>	12	7.59	0	0
<i>Streptococcus gordonii</i>	10	6.33	0	0
<i>Gemella morbillorum</i>	8	5.06	9	28,13
<i>Streptococcus intermedius</i>	7	4.43	1	3,13
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	6	3.80	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	3.80	2	6,25
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	6	3.80	1	3,13
<i>Neisseria mucosa</i>	6	3.80	2	6,25
<i>Streptococcus mitis</i>	6	3.80	0	0
<i>Prevotella melaninogenica</i>	5	3.16	0	0
<i>Prevotella nigrescens</i>	5	3.16	1	3,13
<i>Treponema denticola</i>	5	3.16	0	0
<i>Streptococcus sanguis</i>	4	2.53	1	3,13
<i>Tannerella forsythia</i>	3	1.90	0	0
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	3	1.90	0	0
<i>Fusobacterium nucleatum</i> sp. <i>nucleatum</i>	3	1.90	0	0
<i>Selenomonas noxia</i>	3	1.90	0	0
<i>Streptococcus constellatus</i>	3	1.90	0	0
<i>Actinomyces viscosus</i>	2	1.27	0	0
<i>Campylobacter showae</i>	2	1.27	0	0
<i>Eikenella corrodens</i>	2	1.27	0	0
<i>Eubacterium saburreum</i>	2	1.27	1	3,13
<i>Parvimonas micra</i>	2	1.27	0	0
<i>Veillonella parvula</i>	2	1.27	0	0
<i>Eubacterium nodatum</i>	1	0.63	0	0
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1	0.63	0	0
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	0	0	0	0
<i>Actinomyces israelii</i>	0	0	0	0
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	0	0	0	0
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	0	0	0	0
<i>Campylobacter rectus</i>	0	0	0	0
<i>Fusobacterium nucleatum</i> sp. <i>polymorphum</i>	0	0	4	12,5
<i>Fusobacterium nucleatum</i> sp. <i>vicentii</i>	0	0	0	0
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	0	0	0	0
<i>Propionibacterium acnes</i>	0	0	0	0
<i>Streptococcus oralis</i>	0	0	0	0
<i>Treponema socranskii</i>	0	0	0	0

Após o preparo químico-mecânico (C2), espécies pertencentes aos gêneros *Gemella*, *Leptotrichia*, *Fusobacterium*, *Capnocytophaga*, *Enterococcus*, *Neisseria*, *Streptococcus*, *Prevotella* e *Eubacterium* permaneceram nos canais radiculares, sendo passíveis de detecção.

A **FIGURA 33** demonstra o número de cepas pertencentes a cada gênero, antes (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2) dos canais radiculares.

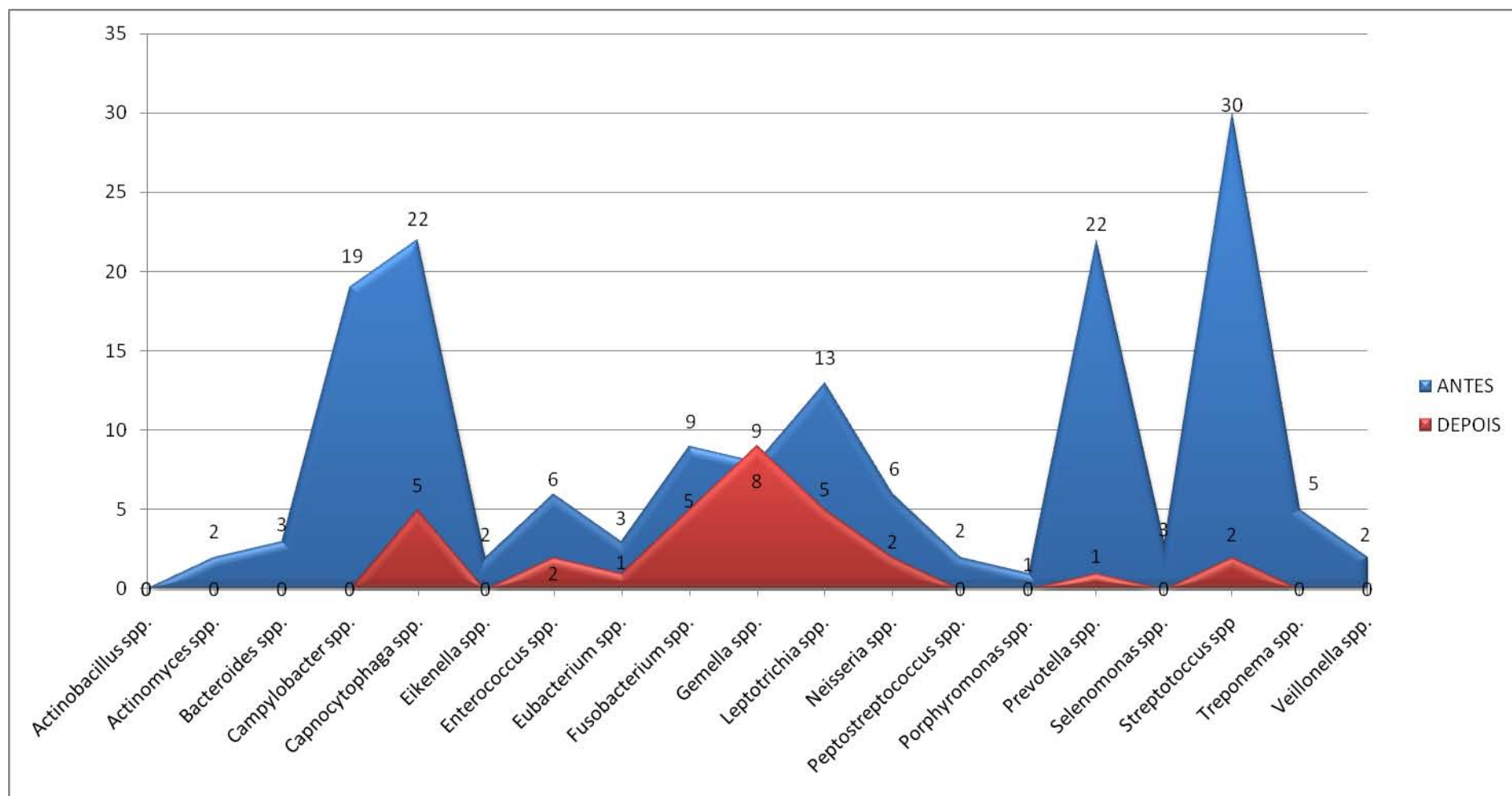


FIGURA 33- Comparação entre a presença de cepas bacterianas, distribuídas em gêneros, antes (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2) dos canais radiculares, detectadas pelo *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*.

Os números e percentuais de espécies bacterianas, detectadas antes (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2) com o NaCl 0,09%, o gel de clorexidina (CHX) 2% e o NaOCl 5,25%, podem ser observados na **TABELA 6**, na **TABELA 7** e na **TABELA 8**, respectivamente.

Quando os canais radiculares foram instrumentados empregando-se NaCl 0,09% como substância auxiliar, as espécies *Gemella morbillorum* (33,3%), *Capnocytophaga sputigena* (22,2%), *Leptotrichia buccalis* (22,2%), e *Neisseria mucosa* (11,1%), persistiram após o preparo químico-mecânico (**TABELA 6**).

TABELA 6– Número e percentual de espécies bacterianas detectadas pelo *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* em C1 e em C2, com o uso de NaCl 0,09%.

Espécies	Nº	C1	%	Nº	C2	%
<i>Campylobacter gracilis</i>	6	12,77	0	0		
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	4	8,51	2	22,2		
<i>Prevotella intermedia</i>	4	8,51	0	0		
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	6,38	0	0		
<i>Gemella morbillorum</i>	3	6,38	3	33,3		
<i>Leptotrichia buccalis</i>	3	6,38	2	22,2		
<i>Streptococcus gordonii</i>	3	6,38	0	0		
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	2	4,26	0	0		
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2	4,26	0	0		
<i>Selenomonas noxia</i>	2	4,26	0	0		
<i>Streptococcus intermedius</i>	2	4,26	0	0		
<i>Streptococcus mitis</i>	2	4,26	0	0		
<i>Treponema denticola</i>	2	4,26	0	0		
<i>Campylobacter showae</i>	1	2,13	0	0		
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	1	2,13	0	0		
<i>Eubacterium saburreum</i>	1	2,13	0	0		
<i>Fusobacterium nucleatum</i> sp. <i>nucleatum</i>	1	2,13	0	0		
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	1	2,13	0	0		
<i>Neisseria mucosa</i>	1	2,13	1	11,1		
<i>Prevotella nigrescens</i>	1	2,13	0	0		
<i>Streptococcus constellatus</i>	1	2,13	0	0		
<i>Streptococcus sanguis</i>	1	2,13	0	0		
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	0	0	0	0		
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	0	0	0	0		
<i>Actinomyces israelii</i>	0	0	0	0		
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	0	0	0	0		
<i>Actinomyces viscosus</i>	0	0	0	0		
<i>Tannerella forsythia</i>	0	0	0	0		
<i>Campylobacter rectus</i>	0	0	0	0		
<i>Eikenella corrodens</i>	0	0	0	0		
<i>Eubacterium nodatum</i>	0	0	0	0		
<i>Fusobacterium nucleatum</i> sp. <i>polymorphum</i>	0	0	1	11,1		
<i>Fusobacterium nucleatum</i> sp. <i>vicentii</i>	0	0	0	0		
<i>Parvimonas micra</i>	0	0	0	0		
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	0	0	0	0		
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0	0	0	0		
<i>Propionibacterium acnes</i>	0	0	0	0		
<i>Streptococcus oralis</i>	0	0	0	0		
<i>Treponema socranskii</i>	0	0	0	0		
<i>Veillonella parvula</i>	0	0	0	0		

As espécies *Capnocytophaga sputigena* (11,1%), *Leptotrichia buccalis* (11,1%), *Capnocytophaga ochracea* (5,6%), *Fusobacterium periodonticum* (5,6%), *Neisseria mucosa* (5,6%), *Enterococcus faecalis* (5,6%), *Prevotella nigrescens* (5,6%), *Streptococcus sanguis* (5,6%) e *Eubacterium saburreum* (5,6%) foram detectadas antes e após o preparo químico-mecânico (C2) com gel de CHX 2%. A espécie *Gemella morbillorum* apresentou nível de detecção superior após o preparo químico-mecânico (C2) (27,8%), sendo detectada inicialmente em 2 amostras e posteriormente em 5 (**TABELA 7**).

TABELA 7– Número e percentual de espécies bacterianas detectadas pelo *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* em C1 e em C2, com o uso de gel de CHX 2%.

Espécies	N°	C1	%	N°	C2	%
<i>Campylobacter gracilis</i>	5	9,1	0	0	0	
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	4	7,3	2	11,1		
<i>Leptotrichia buccalis</i>	4	7,3	2	11,1		
<i>Streptococcus gordonii</i>	4	7,3	0	0		
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	3	5,5	1	5,6		
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	3	5,5	1	5,6		
<i>Neisseria mucosa</i>	3	5,5	1	5,6		
<i>Prevotella intermedia</i>	3	5,5	0	0		
<i>Streptococcus intermedius</i>	3	5,5	0	0		
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	3,6	1	5,6		
<i>Gemella morbillorum</i>	2	3,6	5	27,8		
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2	3,6	0	0		
<i>Prevotella nigrescens</i>	2	3,6	1	5,6		
<i>Streptococcus mitis</i>	2	3,6	0	0		
<i>Streptococcus sanguis</i>	2	3,6	1	5,6		
<i>Treponema denticola</i>	2	3,6	0	0		
<i>Actinomyces viscosus</i>	1	1,8	0	0		
<i>Tannerella forsythia</i>	1	1,8	0	0		
<i>Campylobacter showae</i>	1	1,8	0	0		
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	1	1,8	0	0		
<i>Eubacterium saburreum</i>	1	1,8	1	5,6		
<i>Fusobacterium nucleatum</i> sp. <i>nucleatum</i>	1	1,8	0	0		
<i>Parvimonas micra</i>	1	1,8	0	0		
<i>Streptococcus constellatus</i>	1	1,8	0	0		
<i>Veillonella parvula</i>	1	1,8	0	0		
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	0	0	0	0		
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	0	0	0	0		
<i>Actinomyces israelii</i>	0	0	0	0		
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	0	0	0	0		
<i>Campylobacter rectus</i>	0	0	0	0		
<i>Eikenella corrodens</i>	0	0	0	0		
<i>Eubacterium nodatum</i>	0	0	0	0		
<i>Fusobacterium nucleatum</i> sp. <i>vicentii</i>	0	0	0	0		
<i>Fusobacterium nucleatum</i> sp. <i>polymorphum</i>	0	0	2	11,1		
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	0	0	0	0		
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0	0	0	0		
<i>Propionibacterium acnes</i>	0	0	0	0		
<i>Selenomonas noxia</i>	0	0	0	0		
<i>Streptococcus oralis</i>	0	0	0	0		
<i>Treponema socranskii</i>	0	0	0	0		

Após o preparo químico-mecânico (C2) com NaOCl 5,25%, as espécies *Leptotrichia buccalis* (20%), *Gemella morbillorum* (20%), *Streptococcus intermedius* (20%) e *Enterococcus faecalis* (20%) persistiram aos procedimentos de desinfecção (TABELA 8).

TABELA 8– Número e percentual de espécies bacterianas detectadas pelo *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* em C1 e em C2, com o uso de NaOCl 5,25%.

Espécies	Nº	C1	%	Nº	C2	%
<i>Campylobacter gracilis</i>	6	10,91		0	0	
<i>Leptotrichia buccalis</i>	6	10,91		1	20	
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	5	9,09		0	0	
<i>Prevotella intermedia</i>	5	9,09		0	0	
<i>Gemella morbillorum</i>	3	5,45		1	20	
<i>Streptococcus gordonii</i>	3	5,45		0	0	
<i>Tannerella forsythia</i>	2	3,64		0	0	
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	2	3,64		0	0	
<i>Neisseria mucosa</i>	2	3,64		0	0	
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2	3,64		0	0	
<i>Streptococcus intermedius</i>	2	3,64		1	20	
<i>Streptococcus mitis</i>	2	3,64		0	0	
<i>Actinomyces viscosus</i>	1	1,82		0	0	
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	1	1,82		0	0	
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	1	1,82		0	0	
<i>Eikenella corrodens</i>	1	1,82		0	0	
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	1,82		1	20	
<i>Eubacterium nodatum</i>	1	1,82		0	0	
<i>Fusobacterium nucleatum</i> sp. <i>nucleatum</i>	1	1,82		0	0	
<i>Parvimonas micra</i>	1	1,82		0	0	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1	1,82		0	0	
<i>Prevotella nigrescens</i>	1	1,82		0	0	
<i>Selenomonas noxia</i>	1	1,82		0	0	
<i>Streptococcus constellatus</i>	1	1,82		0	0	
<i>Streptococcus sanguis</i>	1	1,82		0	0	
<i>Treponema denticola</i>	1	1,82		0	0	
<i>Veillonella parvula</i>	1	1,82		0	0	
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	0	0		0	0	
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	0	0		0	0	
<i>Actinomyces israelii</i>	0	0		0	0	
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	0	0		0	0	
<i>Campylobacter rectus</i>	0	0		0	0	
<i>Campylobacter showae</i>	0	0		0	0	
<i>Eubacterium saburreum</i>	0	0		0	0	
<i>Fusobacterium nucleatum</i> sp. <i>polymorphum</i>	0	0		1	20	
<i>Fusobacterium nucleatum</i> sp. <i>vicentii</i>	0	0		0	0	
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	0	0		0	0	
<i>Propionibacterium acnes</i>	0	0		0	0	
<i>Streptococcus oralis</i>	0	0		0	0	
<i>Treponema socranskii</i>	0	0		0	0	

5.3.3.2 ANÁLISE QUANTO AO NÚMERO DE CÉLULAS

Foi constatada grande redução no número de células bacterianas detectadas após os procedimentos de preparo químico-mecânico (C2) dos canais radiculares, em relação ao que se detectou na coleta inicial (C1), conforme pode ser observado na **FIGURA 34**.

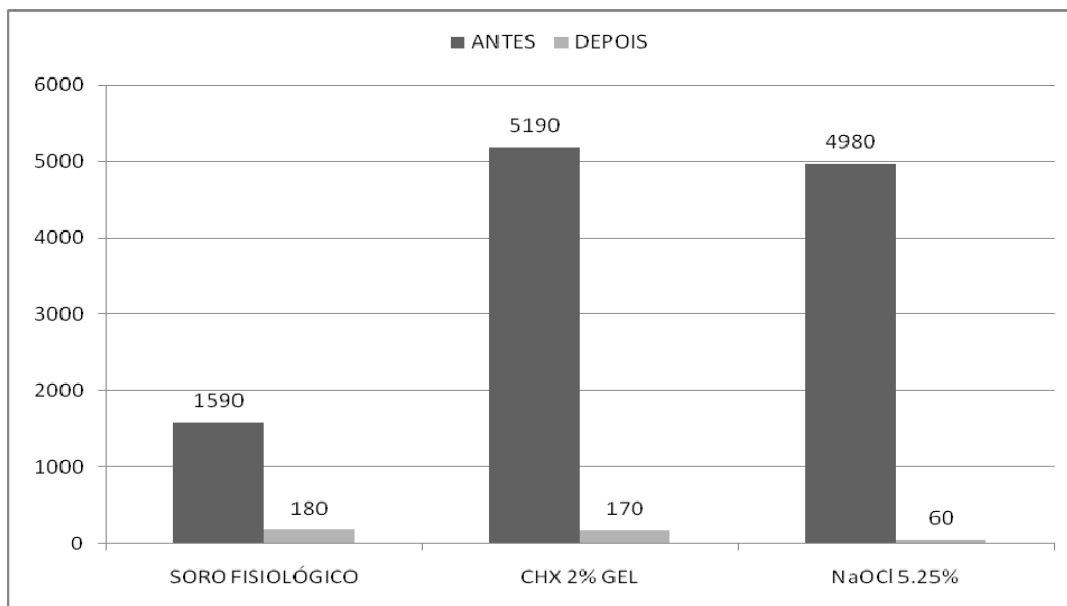


FIGURA 34– Redução do número de células, detectadas através do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, após preparo químico-mecânico (C2) com diferentes substâncias auxiliares.

Na **TABELA 9** pode ser observada essa redução do número de células bacterianas detectadas após os procedimentos de preparo químico-mecânico (C2), em cada um dos espécimes avaliados, em relação ao que foi detectado na coleta inicial (C1).

TABELA 9 – Número de células bacterianas ($\times 10^5$) detectadas pelo *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* antes (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2), nos dentes avaliados).

	NaCl 0,09%	NaCl 0,09%	CHX 2%	CHX 2%	NaOCl 5,25%	NaOCl 5,25%
	C1	C2	C1	C2	C1	C2
Dente	P ₂	P ₂	P ₃	P ₃	P ₄	P ₄
1	0,20	1,00	0	0	8,00	0
2	1,70	0,40	1,40	0,70	1,40	0
3	1,40	0,10	3,70	0	2,60	0,60
4	0,70	0	0	0,10	8,60	0
5	0,30	0	19,30	0,10	0,10	0
6	0,30	0,30	26,80	0,10	10,90	0
7	11,30	0	0,70	0,70	18,20	0
Total	15,9	1,80	51,90	1,70	49,80	0,60

Na **FIGURA 35** observa-se o percentual da redução de células bacterianas detectadas após os procedimentos de preparo químico-mecânico (C2) em relação ao detectado na coleta inicial (C1).

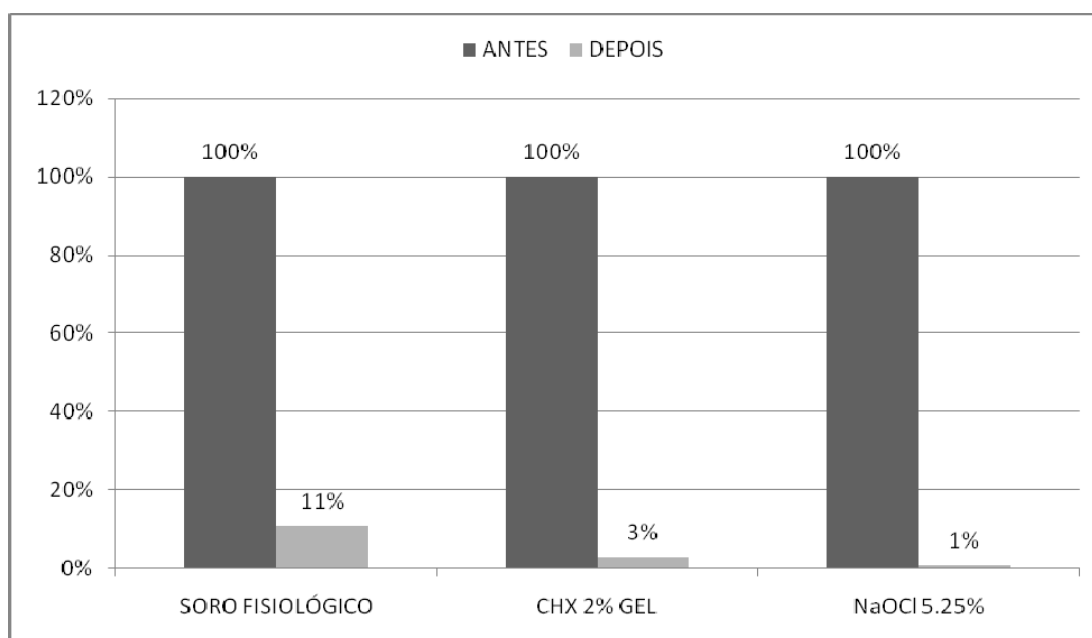


FIGURA 35– Percentual de redução do número de células, detectadas pelo *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, após preparo químico-mecânico (C2) com diferentes substâncias auxiliares.

O emprego do NaCl 0,09% como agente irrigante possibilitou uma redução de 89% da contaminação no interior dos canais radiculares.

No entanto, a utilização do NaOCl 5,25% e da clorexidina gel 2% permitiram uma redução de 99% e 97%, respectivamente, não diferindo entre si ao nível de significância de 5%.

Na **TABELA 10** podem ser observados aspectos relativos ao número ($\times 10^5$) de células bacterianas detectadas, antes (C1) e após o preparo químico-mecânico (C2), com as diferentes substâncias avaliadas.

TABELA 10– Número ($\times 10^5$) de células bacterianas detectadas pelo *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* em C1 e em C2, com as diferentes substâncias testadas.

Espécie	NaCl 0,9%		CHX 2% Gel		NaOCl 5,25%	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Actinomyces israelii</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Actinomyces viscosus</i>	0	0	0,1	0	0,1	0
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Campylobacter gracilis</i>	7,3	0	12,1	0	21,1	0
<i>Campylobacter rectus</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Campylobacter showae</i>	1,0	0	0,1	0	0	0
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	10	0	5,0	0	5,0	0
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	0,2	0	0,3	0,1	0,1	0
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	0,4	0,2	1,3	0,2	2,3	0,1
<i>Eikenella corrodens</i>	0	0	0	0	0,2	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,3	0	5,1	0,1	5,0	0,1
<i>Eubacterium nodatum</i>	0	0	0	0	0,1	0
<i>Eubacterium saburreum</i>	0,1	0	0,1	0,1	0	0
<i>Fusobacterium nucleatum</i> sp. <i>nucleatum</i>	0,1	0	5,0	0	1,0	0
<i>Fusobacterium nucleatum</i> sp. <i>polymorphum</i>	0	0,1	0	0,2	0	0,1
<i>Fusobacterium nucleatum</i> sp. <i>vicentii</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	1,0	0	1,2	0,1	1,1	0
<i>Gemella morbillorum</i>	0,3	0,3	0,2	0,5	1,2	0,1
<i>Leptotrichia buccalis</i>	0,3	0,2	0,4	0,2	1,4	0,1
<i>Neisseria mucosa</i>	1,0	1,0	5,2	0,1	1,2	0
<i>Parvimonas micra</i>	0	0	1,0	0	0,1	0
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0	0	0	0	0,1	0
<i>Prevotella intermedia</i>	0,4	0	1,2	0	0,5	0
<i>Prevotella melaninogenica</i>	0,2	0	0,2	0	0,1	0
<i>Prevotella nigrescens</i>	0,1	0	0,2	0,1	0,2	0
<i>Propionibacterium acnes</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Selenomonas noxia</i>	0,2	0	0	0	0,1	0
<i>Streptococcus constellatus</i>	0,1	0	0,1	0	0,1	0
<i>Streptococcus gordonii</i>	1,2	0	6,2	0	6,1	0
<i>Streptococcus intermedius</i>	1,1	0	0,3	0	0,2	0,1
<i>Streptococcus mitis</i>	0,2	0	0,2	0	1,1	0
<i>Streptococcus oralis</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus sanguis</i>	0,1	0	1,1	0	0,1	0
<i>Tannerella forsythia</i>	0	0	0,1	0	1,1	0
<i>Treponema denticola</i>	0,2	0	0,2	0	0,1	0
<i>Treponema socranskii</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Veillonella parvula</i>	0	0	5,0	0	0,1	0
Total de células bacterianas	15,9	1,8	51,9	1,7	49,8	0,6

6. DISCUSSÃO

O modelo animal cão foi selecionado para a execução deste trabalho pois além de apresentar facilidade de manuseio e manutenção, possui anatomia dentária (Page & Schoroeder, 1982), padrão de mastigação, resposta biológica (Hill, 1932; Dixon & Rickert, 1938) e processo de reparo dos dentes e estruturas de suporte semelhantes ao humano (Citrome *et al.*, 1979; Souza *et al.*, 1989). Outro aspecto que favorece a opção por este tipo de modelo de estudo é o de que apresenta resposta tecidual rápida o suficiente para que o resultado seja obtido em menor período de tempo (Torneck & Smith, 1970; Rowe, 1980; Pitt Ford, 1984), pois o desenvolvimento do cão é muito mais rápido que o do humano (Labeau, 1953; Andrade *et al.*, 2002).

Com o objetivo de obter melhor padronização dos procedimentos a serem efetuados, os dentes empregados neste trabalho foram aqueles que apresentaram aspectos anatômicos semelhantes. Portanto, caninos e molares foram desprezados (Otoboni Filho, 2000). Apenas os segundos, terceiros e quartos pré-molares inferiores, que apresentam anatomia semelhante entre si (Andrade *et al.*, 2002; Kowalesky, 2005), quase totalmente retilínea e amplitude dos canais radiculares, foram utilizados. Assim, as manobras operatórias foram facilitadas, e a padronização dos procedimentos instituídos foi favorecida (Cintra, 2008).

Embora o fato de que todos os dentes de cães apresentem delta apical (Pitts *et al.*, 1982) possa ser considerado uma acentuada diferença em relação aos dentes humanos, isto não corresponde à realidade (Otoboni Filho, 2000). De Deus (1975) relatou que as foraminas são encontradas em 37,2% na média geral dos dentes humanos, assim como Hess & Keller (1988) demonstraram que, em média, 42% dos dentes humanos exibem ramificações periapicais. Seltzer (1971) chegou até mesmo a afirmar que a presença de ramificações apicais nos dentes humanos é uma regra e não uma excessão.

Sinais de dor ou desconforto oral em cães incluem bater com as patas na face ou boca, esfregar a cara no chão ou paredes, mastigação ou movimentos de deglutição excessivos ou inapropriados (Burrows & Harvey, 1985). Quando a condição progride, o cão pode pender sua cabeça para um lado, ter seus hábitos alimentares alterados, perder peso. A sensibilidade é particularmente notada após a ingestão de alimentos ou água (Dillon, 1986). Os cães utilizados nesta pesquisa foram observados diariamente. Todos toleraram bem os procedimentos, e nenhum demonstrou sinais de sofrimento durante o período de observação.

Portanto, nossas observações nesse aspecto clínico corroboram as de Otoboni Filho (2000), que utilizaram método similar para indução de lesões periapicais em cães (exposição ao meio oral por 4/6 meses), ressaltando a desvantagem de outros métodos empregados, que agilizam a instalação das lesões, mas podem promover quadros de infiltrado inflamatório agudo. Essa ocorrência pode passar despercebida ao pesquisador, além de, muitas vezes, ser de difícil controle clínico. O animal, na presença de dor em processo agudo, torna-se irrequieto e tenta mastigar algum objeto duro, donde fraturas dentárias podem advir.

Para o estudo microbiológico dos canais radiculares, seguindo os princípios já detalhados por Gomes (1995), houve a necessidade da promoção de um fácil acesso aos instrumentos utilizados para a coleta das amostras, além da remoção de todo teto da câmara pulpar (Ferreira, 2003; Gadê-Neto, 2004). Desta forma, as aberturas coronárias foram estendidas no sentido mésio-distal, com remoção da ponte de esmalte vestibulo-lingual, porém sem destruição da cúspide mediana. Por ser objetivo desta pesquisa avaliar a presença de microrganismos no interior dos canais radiculares, antes e após o preparo químico-mecânico, a opção por esse tipo de procedimento no acesso proporcionou a exposição total da câmara pulpar, sem que houvesse risco de permanência de um nicho microbiano naquela área (Ferreira, 2003). Esse tipo de procedimento difere do método de acesso descrito por outros autores (Leonardo, 1992; Tanomaru Filho, 1996; Silveira, 1997; Berbert, 1999). Estes, com o objetivo de propiciar maior resistência às paredes

dentárias e evitar possíveis fraturas, realizaram uma abertura coronária na fossa mesial e outra na distal da face oclusal dos dentes, mantendo a ponte vestibulo-lingual. Barker & Lockett (1971) relataram que a manutenção das cúspides dos pré-molares diminui a ocorrência de fraturas coronárias. Entretanto, no presente estudo, embora a referida ponte tenha sido removida, não houve presença de fraturas no tempo do experimento, com exceção de um dente, onde se observou uma pequena fratura coronária.

Neste trabalho, a utilização do microscópio clínico, que pode propiciar visualização de aspectos internos e profundos do canal radicular, com ampliação de até 20 vezes e melhor iluminação do campo operatório (Souza-Filho & Teixeira, 1999, 2001; Rabang, 2003; Ferreira, 2003; Gadê-Neto, 2004), foi de grande importância para a condução de todas as fases da metodologia. Com este recurso, a abertura de acesso coronário foi conduzida conservadoramente e a localização dos canais foi facilitada, concordando com Baldassari-Cruz *et al.* (2002), que demonstraram o aumento da habilidade do clínico na localização de canais de difícil acesso. O microscópio também facilitou a remoção da grande quantidade de contaminantes coronários que preenchem a câmara pulpar, que ficaram expostas ao meio oral por todo o período do experimento. Além da remoção mecânica dos contaminantes coronários, de acordo com princípios que devem ser observados, foi realizada a descontaminação do campo operatório previamente à coleta microbiológica (Möller, 1966; Byström & Sundqvist, 1983; Gomes, 1995; Gomes *et al.*, 1994, 1996a,b,c; Gomes, 2002; Baumgartner *et al.*, 1999; Siqueira Jr. *et al.*, 2000, 2001a,b,c,d).

As coletas da superfície externa da coroa e da face interna da cavidade de acesso resultaram em cultura negativa, confirmando a desinfecção do campo operatório e da câmara pulpar.

O meio de transporte RTF, utilizado no presente trabalho, é eficiente em manter a viabilidade das células bacterianas e impedir a sua proliferação por até 24 horas em temperatura ambiente (Syed & Loesche, 1972). Além disto, embora as sessões no centro cirúrgico do biotério fossem longas, as coletas feitas

inicialmente não eram prejudicadas, pois ficavam em jarras de anaerobiose e, eventualmente, o auxiliar levava as coletas já feitas para o laboratório de microbiologia, ainda durante o procedimento nos cães. Isto ocorria de tal forma que não fossem ultrapassadas as 4 horas da coleta até o processamento (Ferreira, 2003).

O método clássico da coleta e cultura bacteriana pode sofrer interferências de agentes químicos ou físicos, dando falsos resultados. No presente trabalho, após o processamento das coletas antes do preparo químico-mecânico (C1), em 4 dentes não foi conseguido o cultivo de bactérias. Este fato pode ser devido a descontaminação do campo operatório, que foi realizada com H_2O_2 30% e NaOCl 5,25% (Möller, 1966; Dougherty *et al.*, 1998; Pinheiro *et al.*, 2003a, b; Ferreira, 2003; Jacinto, 2006). Embora estas substâncias tenham sido neutralizadas com tiosulfato de sódio 5%, uma possível contaminação química do espaço pulpar pode ter ocorrido devido ao menor comprimento radicular e ao maior diâmetro dos canais dos dentes de cães.

Os resultados mostraram que os canais com ausência de crescimento bacteriano apresentavam menores comprimentos de trabalho (CRT), enquanto crescimento bacteriano foi observado em 100% das coletas dos dentes com maiores CRT.

Além disso, a não detecção de microrganismos através do método de cultura, já foi observada por Yoshida *et al.* (1987), Gomes *et al.*, (1994), Jacinto *et al.* (2003), Rabang (2003), Martinho (2007), podendo estar relacionada à presença de espécies não cultiváveis, a espécies não sobreviventes durante as diversas fases do processamento laboratorial e ao baixo número de células bacterianas, impossibilitando a detecção pelo método de cultura.

Mais de 700 espécies bacterianas têm sido detectadas na cavidade oral (Aas *et al.*, 2005). Estima-se que menos de 1% das bactérias do planeta e menos de 50%/60% das presentes na microbiota oral ainda não foram cultivadas (Aas *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2005). É possível que muitos patógenos verdadeiros ainda não tenham sido detectados, por não serem suficientemente sensíveis para sua

detecção (Siqueira Jr. & Lopes, 1999). Em trabalho de Wade *et al.* (1997) algumas cepas de *Porphyromonas endodontalis* e de *Fusobacterium nucleatum* apenas foram detectáveis pela técnica molecular, não tendo sido possível cultivá-las. O crescimento de microrganismos anaeróbicos fastidiosos pela cultura pode não ocorrer (Siqueira Jr. *et al.*, 2001). Além disto, o método de cultura somente é capaz de revelar bactérias vivas, e é menos sensível na identificação de baixos números de células bacterianas (Tomazinho *et al.*, 2007). É conveniente lembrar que resultados negativos não indicam apenas ausência de bactérias, mas também concentração bacteriana insuficiente para que ocorra o crescimento em meio de cultura, ou falha na técnica microbiológica.

Não foi intenção do presente estudo comparar a detecção de microrganismos pelos dois métodos utilizados, pois, Moraes *et al.* (2002) já haviam concluído que não seria possível considerar tal aspecto.

Siqueira Jr. *et al.* (2002) compararam os métodos PCR e *Checkerboard* DNA-DNA *hybridization* na detecção de patógenos endodônticos em 50 casos de infecções endodônticas primárias em humanos e constataram resultados coincidentes mas também discrepâncias entre os métodos, onde por meio do PCR houve resultado positivo e por meio do *Checkerboard* o resultado foi negativo. Os autores relataram que na ausência de um método padrão de referência incontestável, nenhuma conclusão definitiva poderia ser tirada sobre a capacidade de um dos métodos refletir melhor a realidade. Sabe-se, no entanto, que o método *Checkerboard* DNA-DNA *hybridization*, como foi concebido, não amplifica o DNA, enquanto o PCR o faz.

É, portanto, uma das características negativas da técnica do *Checkerboard* DNA-DNA *hybridization* utilizada no presente estudo a não ampliação do DNA, o que já tem sido apontado como uma desvantagem do método (Chan, 2004). Assim, modificações têm sido introduzidas por diferentes autores (Brito *et al.*, 2004; Roças *et al.*, 2004), no sentido de promover a ampliação do DNA microbiano antes da aplicação das amostras no *Checkerboard*. No entanto, mesmo utilizando a técnica do *Checkerboard* original, Sassone *et al.* (2007)

investigando microbiota de dentes humanos com infecção endodôntica primária, detectaram alta prevalência de *Enterococcus faecalis* (89,3%) naquelas amostras, e ressaltaram que seus resultados foram similares aos de Sedley *et al.* (2006) (67,5%) e aos de Gomes *et al.* (2006) (82%), que utilizaram o PCR em suas investigações.

Nieves *et al.* (1997), em pesquisa de identificação bacteriana de placas dentárias de cães, com método de cultura, observaram que alguns gêneros não puderam ser especificados porque as características das colônias ou as características bioquímicas não puderam ser correlacionadas com espécies conhecidas daqueles gêneros.

Pela metodologia da cultura empregada neste estudo, as coletas microbiológicas dos canais radiculares em C1 revelaram uma microbiota predominantemente anaeróbia facultativa e Gram-positiva. Essa microbiota difere daquela encontrada em canais radiculares com polpas necrosadas e lesão periapical em dentes humanos, em trabalhos que empregaram a cultura, que apresentam uma microbiota predominantemente anaeróbia estrita com iguais proporções de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Sundqvist, 1992; Gomes, 1995; Gomes *et al.*, 1994a,b, 1996a,b,c; Baumgartner *et al.*, 1999; Gomes, 2002). Embora tenha sido isolado um maior número de bactérias anaeróbias facultativas, os métodos microbiológicos empregados neste estudo foram adaptados para isolar o maior número de espécies bacterianas possível, inclusive anaeróbios estritos (Gomes, 1995; Gomes, *et al.*, 1994a,b, 1996 a,b,c; Gomes, 2002).

Ferreira (2003) empregando a mesma metodologia de cultura, encontrou maioria de anaeróbios estritos, em cães, perfil similar ao encontrado por autores que conduziram avaliação por cultura em humanos (Sundqvist, 1992; Gomes, 1995; Gomes *et al.*, 1994a,b, 1996a,b,c; Baumgartner *et al.*, 1999; Gomes, 2002; Jacinto, 2006). Porém, o método de indução utilizado por Ferreira (2003) fechou a câmara pulpar, após 7 dias de exposição ao meio oral, o que provavelmente possibilitou um ambiente anaeróbio, propício ao crescimento dos estritos. Além

disto, os modelos animais cães utilizados por Ferreira (2003) apresentaram presença de edemas e fístulas e uma microbiota aneróbia estrita, com predominância de Gram-positivos, que corroboram os achados de Sousa (2000) em humanos com abscessos periapicais.

A comparação da microbiota presente em canais radiculares com lesões periapicais dos dois diferentes métodos de indução pelo método da cultura já tem registro na literatura. Com o objetivo de melhor estudar o modelo cão para a pesquisa em Endodontia, foram realizados trabalhos nos quais se avaliou a microbiota dos canais radiculares (Ferreira *et al.*, 2002a) e a evolução radiográfica de lesões periapicais (Rabang *et al.*, 2002) utilizando dois métodos de indução: dentes contaminados com a microbiota oral por 1 semana e posteriormente selados; e dentes que permaneceram abertos por todo período do experimento (120 dias). Nesses estudos, observou-se que nos canais dos dentes selados houve uma maior proporção de anaeróbios estritos, o gênero *Fusobacterium* foi estatisticamente mais isolado em relação aos dentes fechados e as lesões induzidas nesses dentes foram significativamente maiores que as dos dentes abertos. Alguns dentes que foram selados também desenvolveram abscessos durante o período experimental e reabsorções radiculares externas foram observadas em algumas imagens radiográficas dos dentes desse grupo. Estas observações radiográficas são semelhantes aos achados de Tanomaru *et al.* (2008) que observaram reação periapical e reabsorção de tecido mineralizado menos intensas no grupo de dentes abertos, sem perfuração do platô apical, quando compararam métodos de indução de reação periapical em dentes de cão pelos métodos fechados e abertos com ou sem perfuração do platô apical.

Ferreira *et al.*, em 2006, também compararam os métodos de indução com câmara selada e câmara aberta. Concluíram que o método em que a câmara foi selada após 7 dias de exposição ao meio oral produziu microbiota no interior dos canais radiculares de cães similar àquela encontrada em humanos, com maioria de anaeróbios estritos Gram-negativos. Seus achados diferiram dos de Tanomaru-

Filho *et al.* (2005), que avaliaram a influência do selamento coronário e da perfuração apical, rompendo o platô apical em cães, na indução de lesões periapicais. Embora estes autores tenham também concluído que foi maior o número de aneróbios estritos isolados pelos métodos de indução por eles testados, observaram que foi o método aberto, sem selamento após 7 dias de exposição, que apresentou maior número de microrganismos no interior dos canais radiculares.

Na coleta inicial (C1) do presente estudo, quando o método do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foi empregado, em que as sondas utilizadas foram predominantemente de bactérias anaeróbias estritas Gram-negativas, foi encontrada maioria de anaeróbios estritos, com predominância de Gram-negativos. Seria interessante que fossem analisadas amostras de canais que tiveram lesões periapicais induzidas pelo método de câmara fechada, como na metodologia utilizada por Ferreira, em 2003, pelo método do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, para que também fossem comparados os resultados frente a este método de detecção.

A microbiota presente no interior do sistema de canais radiculares é o resultado de fatores de seleção, tais como: tensão de oxigênio, fatores nutricionais e interações bacterianas, formando um ambiente propício para o desenvolvimento de determinadas espécies (Sundqvist, 1992). Pelo método da cultura, no presente estudo, a presença de uma maior proporção de anaeróbios facultativos nos canais estudados pode estar relacionada ao fato desses dentes possuírem menores comprimentos, o que dificultaria a geração de anaerobiose na porção apical desses canais, diferentemente do que ocorre em dentes humanos (Baumgartner *et al.*, 1991; Sundqvist, 1992). Enquanto estes apresentam, em sua maioria, comprimento médio entre 19 e 27 mm (De Deus, 1960), os CRT dos dentes estudados variaram entre 9 e 14 mm. Observou-se no presente estudo que a proporção de anaeróbios estritos era menor nos dentes com menor CRT. Estes dentes, que eram representados em sua maioria pelos P₂, também apresentaram

menores áreas de lesões periapicais induzidas. Da mesma forma, os P₄ apresentaram os maiores CRT e as maiores áreas de lesão, e os P₃, valores intermediários entre os P₂ e os P₄.

Na detecção pelo *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, método com maior sensibilidade para detecção de anaeróbios estritos, e onde as sondas de DNA utilizadas foram predominantemente para este tipo de espécie, o perfil microbiano encontrado foi diferente e não foi possível encontrar associação estatisticamente significativa entre os aspectos radiográficos e microbiológicos observados. Entretanto, associações significantes foram registradas entre espécies microbianas detectadas por esse método molecular, tendo o número de detecções sido maior que o encontrado pela Cultura. Isto corrobora o que registram outros autores, quando afirmam, à luz de seus resultados, que métodos moleculares detectam maior quantidade e diversidade de microrganismos (Soriano de Souza *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2006; Sedley *et al.*, 2006; Sassone *et al.*, 2007, 2008; Siqueira Jr., 2008).

Embora sem associação estatisticamente significativa, observou-se que quanto maior a área da lesão, maior o número de espécies microbianas isoladas, o que concorda com os achados prévios de Sundqvist (1976, 1992).

Seltzer *et al.* (1964), Snyder *et al.* (1966), Rowe & Binnie, (1974) não observaram correlação entre o tamanho aparente da lesão periapical, radiograficamente, e a real extensão da lesão, histologicamente, e Pitt Ford (1984) concluiu que as radiografias não são um substituto satisfatório para o exame histológico na detecção de presença ou ausência de doença periapical em cães. Entretanto, Allard *et al.* (1987) e Leonardo *et al.* (1994) observaram correlação entre seus achados radiográficos e microscópicos.

Neste estudo, as áreas das imagens das lesões periapicais nas radiografias variaram de 0,06 a 0,18 cm². Sugerimos, então, que estudo futuro avalie histologicamente o desenvolvimento de lesões periapicais induzidas. Allard *et al.*

(1987) e Leonardo *et al.* (1994) observaram correlação entre seus achados radiográficos e microscópicos.

Durante o tempo do experimento, clinicamente, não foram observadas exarcebações agudas (edema e abscessos). Como os processos agudos estão relacionados à presença de bactérias anaeróbias estritas e Gram-negativas (Gomes, 1995; Gomes *et al.*, 1994a,b; Gomes, 1996a,b,c; Gomes, 2002), a ausência, nos casos estudados, de aspectos clínicos característicos de processos agudos pode ser explicada pela presença de uma microbiota endodôntica predominantemente anaeróbia facultativa e Gram-positiva.

Na cavidade oral do cão, há uma prevalência de espécies de *Streptococcus* e *Staphylococcus*, seguidos de *Actinomyces* e enterobactérias (Dillon 1976; Misirligil & Tuncer, 1990; Stepanović *et al.*, 2001). O presente trabalho mostrou que os *Streptococcus* e *Staphylococcus* também são importantes componentes da microbiota de canais radiculares infectados pela metodologia empregada, na qual os canais estavam em contato direto com o meio oral. A microbiota periodontal de dentes de cães tem sido estudada (Kornman *et al.*, 1981; Renvert *et al.*, 1996), porém, trabalhos que identifiquem a microbiota de canais radiculares desses animais ainda são escassos na literatura.

Fournier *et al.* (2001) através de comparação pela metodologia de DNA com a seqüência do gene 16S rRNA, propuseram uma nova espécie, *Porphyromonas gulae*, que é isolada do sulco gengival de vários animais e distinta da *Porphyromonas gingivalis* de origem humana, porém muito parecida. A principal diferença está na catalase positiva das isoladas em animais. Este poderia ser um outro fator que dificulte a identificação deste tipo de bactéria, pela cultura, em animais.

Em relação a C2, os resultados do presente estudo mostraram que alguns microrganismos não estavam presentes em C1 e foram detectados em coletas posteriores (após preparo químico-mecânico). Provavelmente, a presença desses microrganismos na coleta inicial (C1) ficou mascarada pela grande quantidade de

celulas, pois podiam estar em menor número ou até protegidos pelo biofilme. Este foi o caso da espécie *Fusobacterium nucleatum* sp. *polymorphum*, que após o preparo químico-mecânico pode ser detectada nos 3 grupos de substâncias químicas-auxiliares testados. Musson (2002) ressaltou a predominância desta espécie sobre as outras, embora no presente estudo a mesma só tenha sido detectada em C2, demonstrou maior resistência aos procedimentos de desinfecção.

Espécies de *Fusobacterium* ssp. são comumente encontradas na microbiota da cavidade humana. Embora até 7 espécies de fusobactéria sejam reportadas como patogênicas, *Fusobacterium nucleatum* e *Fusobacterium necroforum* são os mais comumente isolados nas infecções humanas (Jacinto *et al.*, 2008). Ressalta-se, portanto, que o *Fusobacterium nucleatum*, que é um espiroqueta anaeróbio estrito, comumente é encontrado na cavidade oral humana (Ogawa *et al.*, 2006), tendo sido intimamente associado com doenças periodontais humanas e pode ser agente causador de outras infecções, tais como pericardite, artrite séptica e abscessos de amígdalas e fígado (Bolstad *et al.*, 1996). Entretanto, o papel das subespécies do *Fusobacterium nucleatum* ainda não foi determinado nas infecções endodônticas (Moraes *et al.*, 2002), embora exista registro de que sua detecção em dentes sintomáticos tenha sido duas vezes maior do que em assintomáticos (Jacinto *et al.*, 2003). Assim, a detecção, no presente estudo, deste gênero microbiano em C2, corrobora o concluído por Jacinto *et al.* (2008), que, pela frequência com que esse microrganismo foi isolado em infecções primárias em humanos, sugeriu que o mesmo deva ter papel importante nesta patogenia.

Chan *et al.* (2004) afirmaram que, embora o *checkerboard* DNA-DNA *hybridization* consistentemente tenha revelado mais espécies e números de bactérias por amostras do que a cultura, o mesmo é susceptível a falsos positivos e o DNA pode ser perdido durante o processamento, resultando em falso negativo. Socranscki *et al.* (2004) ressaltaram, no entanto, que a especificidade da técnica ocorre num percentual de 93,5%, e que as reações cruzadas, quando ocorreram, sempre foram intragênero e bastante limitadas.

Pela cultura não foi detectado crescimento em 4 amostras em C1, e em 2 destas, nem mesmo pelo *Checkerboard* DNA-DNA *Hybridization* foi possível detectar microrganismos. Mais uma vez observa-se o aspecto do processo de desinfecção da câmara radicular, prévio às coletas, em que se utilizou NaOCl 5.25%, relacionado com o tamanho curto dos dentes avaliados.

É interessante ressaltar que as DNases produzidas por algumas espécies de microrganismos existentes em infecções do canal radicular (Leduc *et al.*, 1995), podem degradar o DNA livre no ambiente microbiano investigado. Além deste aspecto, Siqueira Jr. (2008) ressalta que as DNases são uma preocupação para aqueles que lidam com métodos moleculares, pois podem ser carregadas com a amostra e degradar o DNA produzindo um falso negativo.

Gemella morbillorum tem sido relacionada a infecções primárias e resistentes em Endodontia (Gomes *et al.*, 2008). Descritas como “patógenos oportunistas” *Gemellae* são capazes de causar infecções severas e generalizadas, inclusive tendo sido relacionadas a bacteremia e endocardite (La Scola & Rauoult, 1998). Em infecções endodônticas têm sido reportadas com o uso de diferentes técnicas como Cultura (Sundqvist, 1992; Jacinto *et al.*, 2003) e *Checkerboard* (Siqueira Jr. & Roças, 2000; Siqueira Jr. *et al.*, 2001c). A alta prevalência de *Gemella morbillorum* encontrada no presente estudo, inclusive persistindo mesmo em C2, corrobora a suspeita de que este microrganismo apresenta papel de destaque na infecção endodôntica, devendo ser investigados, em trabalhos futuros, seus fatores de virulência, susceptibilidade antimicrobiana e relação com o sistema imune do hospedeiro (Gomes *et al.*, 2008).

Estudos no campo da instrumentação endodôntica que não empregaram substâncias químicas-auxiliares com propriedade antibacteriana reportaram que a ação mecânica da instrumentação e irrigação foi efetiva em reduzir significativamente o número de células bacterianas no canal radicular (Byström & Sundqvist, 1981; Siqueira Jr. *et al.*, 1999). Entretanto, na maioria das vezes, a total eliminação das bactérias não foi observada.

No presente estudo, embora as substâncias testadas apresentem capacidade antimicrobiana, esse mesmo aspecto foi observado, pois grande redução bacteriana sob a ação do preparo químico-mecânico, independente das substâncias químicas-auxiliares testadas, foi alcançada. Isto está em concordância com os achados neste tipo de investigação conduzida em humanos, onde, apesar da constatação de altas taxas de redução bacteriana, os 100% não foram alcançados (Waltimo *et al.*, 2005; Soriano de Souza *et al.*, 2005; Vianna *et al.*, 2006b; Siqueira Jr. *et al.*, 2007; Vianna *et al.*, 2008). É consonante o conceito da importância do preparo químico-mecânico no combate à infecção durante a terapia endodôntica e a busca de substâncias químicas-auxiliares que sejam efetivas. Fabricius *et al.* (2006) ressaltaram, inclusive em estudo conduzido no modelo animal macaco, que quando os microrganismos permaneceram no interior do canal após o tratamento endodôntico, 79% dos canais apresentaram lesões periapicais que não regrediram após 2-2,5 anos.

Siqueira Jr. *et al.* (2007) concluíram, em estudo conduzido em humanos, que a solução de clorexidina 0,12% reduziu significativamente o número de bactérias intra-canal, mas falhou em liberar totalmente o canal radicular de bactérias em 50% dos casos por eles avaliados. A maior taxa de bactérias em suas amostras após preparo químico-mecânico foi de Gram-positivos, o que difere dos resultados do presente estudo, em que a maior taxa em C2 foi de Gram-negativas.

Outro aspecto é o que corrobora a importância da concentração de clorexidina utilizada na presente pesquisa, já que Sassone *et al.* (2003) concluíram que, para que se obtenha um espectro antimicrobiano maior é necessário que concentrações maiores que 0,12% sejam utilizadas. Vianna *et al.* (2004) concluíram que a ação antimicrobiana do NaOCl e da clorexidina está relacionada ao tipo, concentração e forma de apresentação dos irrigantes, assim como à susceptibilidade bacteriana.

Foi observada grande redução bacteriana sob a ação do preparo químico-mecânico, independente das substâncias auxiliares testadas. É importante ressaltar, porém, que a técnica de irrigação com o gel de clorexidina 2% utilizada à época da realização da presente pesquisa, não foi associada ao uso de NaCl 0,09%, hoje em dia preconizada (Cintra, 2008). Pode-se questionar então se, caso o NaCl 0,09% tivesse sido usado, uma redução ainda maior no grupo da clorexidina gel 2% teria sido alcançada, já que o mesmo poderia ajudar na remoção do DNA remanescente. O mesmo poderia ter acontecido caso o EDTA 17% houvesse sido utilizado.

Embora Vianna *et al.* (2006b), em investigação em humanos, utilizando contagem de colônias e *Checkerboard*, tenham observado que tanto o NaOCl 2,5% quanto a clorexidina gel 2% obtiveram sucesso na redução do número de bactérias na maioria dos casos avaliados, os mesmos concluíram que o NaOCl 2,5% se mostrou superior, quando acessado por ambos os métodos. Por outro lado, Zamany *et al.* (2003) demonstraram que a solução de clorexidina 2%, usada como irrigação final, reduziu significativamente as concentrações bacterianas em canais radiculares que haviam sido irrigados com NaOCl 1%. Em concordância, Wang *et al.* (2006) concluíram que a clorexidina gel 2% é um efetivo desinfetante do canal, ressaltando que investigações e estudos comparativos futuros devam ser conduzidos.

Estas diversidades sugerem que outras metodologias, *in vivo*, devam ser aplicadas avaliando a clorexidina gel 2% associada ao NaCl 0,09%, assim como ao EDTA 17%.

Ercan *et al.* (2004) bem concluíram que uma possível vantagem clínica da clorexidina sobre o NaOCl seja a de que, mesmo que os dois sejam efetivos como agentes antimicrobianos, a clorexidina é relativamente não tóxica, sendo um agente de amplo espectro e possui ação residual, com menor potencial de efeitos adversos.

Há que se ressaltar que, mais recentemente, pressões de ordem legal, originadas por consciência de proteção aos animais em muitos países, inclusive no nosso, dificultam ou proíbem o uso de modelos animais em pesquisa. Desta forma, ressalta-se ainda mais a relevância da oportunidade de conduzir pesquisa no modelo cão. Em nosso estudo, procuramos desenvolver nossas investigações em diferentes aspectos, objetivando aproveitar ao máximo esta oportunidade ímpar. Portanto, além da análise radiográfica e da análise microbiológica por dois diferentes métodos em relação ao método de indução de lesão periapical, avaliamos ainda as soluções auxiliares empregadas, e encontramos-nos em processo de avaliação histopatológica do processo de reparo tecidual.

7. CONCLUSÃO

Embasados nos resultados obtidos e nas condições experimentais do presente estudo, concluiu-se que:

1. Existe uma relação entre comprimento do dente, tamanho da lesão e o tipo de microbiota, em que quanto mais curto o dente, menor o tamanho da lesão e menor presença de microrganismos;
2. A microbiota dos canais radiculares de dentes de cães com lesão periapical induzida, por exposição ao meio oral, identificada pela cultura é predominantemente anaeróbia facultativa e Gram-positiva, representada pelos gêneros *Streptococcus* e *Staphylococcus*; quando identificada pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, é predominantemente anaeróbia estrita e Gram-negativa, com maior incidência de bactérias pertencentes aos gêneros *Streptococcus*, *Prevotella* e *Capnocytophaga*; e
3. Tanto a clorexidina gel 2% quanto o NaOCl 5,25% associado ao EDTA 17% utilizados no preparo químico-mecânico são capazes de reduzir qualitativa e quantitativamente os microrganismos presentes no interior do canal radicular.

REFERÊNCIAS

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(11): 5721-32.
2. Abou-Rass M, Oglesby SW. The effects of temperature, concentration and tissue type on the solvent ability of sodium hypochlorite. *J Endod.* 1981; 7: 376-7.
3. Abou-Rass M, Piccinino MV. The effectiveness of four clinical irrigation methods on the removal of root canal debris. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1982; 54(3): 323-8.
4. Allard U, Strömberg U, Strömberg T. Endodontic treatment of experimentally induced apical periodontitis in dogs. *Endod Dent Traumatol.* 1987; 3: 240-4.
5. Allaker RP, Lloyd DH, Bailey RM. Population sizes and frequency of *stafilococci* at mucocutaneous sites on healthy dogs. *The Veterinary Record.* 1992; 30: 303-4.
6. Allaker RP, de Rosaryo R, Young KA, Hardie M. Prevalence of *Porphyromonas* and *Prevotella* species in the dental plaque of dogs. *The Veterinary Record.* 1997a; 140: 147-8.
7. Allaker RP, Young KA, Langloist T, de Rosaryo R, Hardie M. Dental plaque flora of the dog with reference to fastidious and anaerobic bacteria associated with bites. *J Vet Dent.* 1997b; 14(4): 127-130.
8. Andrade A, Pinto SC, De Oliveira RS. Animais de laboratório-criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2002.
9. Araújo-Filho NC. Neoformação óssea em seios maxilares de macacos elevados e enxertados com hidroxiapatita e plasma rico em plaquetas. [Dissertação]. Rio de Janeiro: FO/UFRJ; 2001.
10. Assunção PS. Análise Radiográfica, Histológica e Histométrica da Sutura Palatina Mediana de Primatas Jovens (*Cebus apella*) Submetidos à Expansão Maxilar. [Dissertação]. Rio de Janeiro: FO/UFRJ; 1992.
11. Ayhan H, Sultan N, Cirak M, Ruhi MZ, Bodu H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. *Int Endod J.* 1999; 32: 99-102.

12. Baldassari-Cruz LA, Lilly JP, Rivera EM. The influence of dental operating microscope in locating the mesiolingual canal orifice. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 93: 190-4.
13. Baltieri PWQ, Gomes BPFA, Gadê-Neto CR, Quadros I, Zaia AA, Teixeira FB. Estudo da anatomia interna de dentes de cães através do método de diafanização. *Braz Oral Res.* 2002; 16: 64, Ib024.
14. Barker BCW, Lockett BC. Utilization of the mandibular premolars of the dog for endodontic research. *Austral Dent J.* 1971; 16(5): 280-6.
15. Baumgartner JC, Mader CL. A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens. *J Endod.* 1987; 13(4): 147-57.
16. Baumgartner JC, Falkler Jr WA. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endod.* 1991; 17(8): 380-3.
17. Baumgartner JC, Cuenin PR. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. *J Endod.* 1992; 18: 605-12.
18. Baumgartner JC. Endodontic microbiology. *In: Walton RE, Torabinejad M. Principles and practice of endodontics.* 1^a ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1997. Cap. 16, p. 278.
19. Baumgartner JC, Watkins BS, Bae KS, Xia T. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *J Endod.* 1999; 25(6): 413-5.
20. Baumgartner JC, Watkins BS, Bae KS, Xia T. Identification of spirochetes (Treponemes) in endodontic infections. *J Endod.* 2003; 29: 794-7.
21. Becking AG. Complications in the use of hypochlorite during endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991; 71: 346-8.
22. Benatti O, Valdrighi L, Biral RR, Pupo J. A histological study of the effect of diameter enlargement of the apical portion of the root canal. *J Endod.* 1985; 11(10): 428-34.
23. Berbert FLCV. Análise histológica da reparação apical e periapical pós-tratamento endodôntico de dentes de cães com reação periapical crônica induzida, em função do curativo de demora com Calen/PMCC ou Calasept, e da obturação do canal radicular com Sealapex ou AH Plus. [Tese] Bauru: FOB/USP; 1999.

24. Berbert FLCV, Leonardo MR, Silva LA, Tanomaru Filho M, Bramante CM. Influence of root canal dressings and sealers on repair of apical periodontitis after endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 2002; 93(2): 184-9.
25. Berg JO; Nord CE. A method for isolation of anaerobic bacteria from endodontic specimens. *Scand J Dent Res*. 1973; 81(2): 163-6.
26. Bergenholtz G; Crawford JJ. Endodontic Microbiology. In: Walton RE, Torabinejad M. Principles and practice of endodontics. 1st ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1989. p. 267-282.
27. Bergenholtz G, Wikesjö UM, Sorensen RG, Xiropaidis AV, Wozney LM. Observations on healing following endodontic surgery in nonhuman primates (*Macaca fascicularis*) effects of rhBMP-2. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 101(1): 116-25.
28. Bernabé PFE. Estudo histopatológico realizado em dentes de cães com lesão periapical após apicectomia e tratamento endodôntico via retrógrada. Influência do nível da obturação e do material obturador. [Tese – Livre Docência]. Araçatuba: FOA/UNESP; 1994.
29. Bernabé PFE, Holland R, Cintra LTA, Bernabé DG. Comportamento dos tecidos periapicais de dentes de cães, com lesões periapicais, submetidos à obturação retrógrada convencional com o auxílio do ultra-som, empregando-se ou não o microscópio clínico odontológico. *J Appl Oral Sci*. 2003; 11: 257-7.
30. Bhaskar SN, Rappaport HM. Histologic evaluation of endodontic procedures in dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1971; 31(4): 526-35.
31. Block RM, Lewis RD, Sheats JB, Burke, SH. Antibody formation to dog pulp tissue altered by AH-26 sealer via the root canal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1979; 48(2): 169-74.
32. Bloomfield SF, Miles GA. The antibacterial properties of sodium dichloroisocyanurate and sodium hypochlorite formulations. *J Appl Microbiol*. 1979; 46:65-73.
33. Bolstad AI, Jensen HB, Barkken V. Taxonomia, biology and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum* *Clin Microbiol Rev*. 1996; 9: 55-71.
34. Bowen WH. Ethical use of animals. *J Dent Res*. 1994; 73(11): 1773-1777.

35. Brito LCN, Teles FR, Teles RP, França EC, Ribeiro-Sobrinho AP, Haffajee AD, Socrancky SS. Use of multiple-displacement amplification and checkerboard DNA-DNA hybridization to examine the microbiota of endodontic infections. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 3039-49.
36. Brook I. Human and animal bite infections. *J Pharm Pract.* 1989; 28: 713-8.
37. Burrows CF, Harvey CE. Oral examination and diagnostic techniques. *In:* Harvey CE. *Veterinary Dentistry.* Philadelphia, USA: W.B. Saunders Company; 1985. p. 23-33.
38. Byström A, Sundqvist, G. Bacteriological evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res.* 1981; 89: 321-8.
39. Byström A; Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1983; 55(13): 307-12.
40. Byström A; Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J.* 1985; 18: 35-45.
41. Callahan JR. Sulphuric acid for opening root-canals. *Dent Cosmos.* 1894; 36(12): 957-9.
42. Chan S, Mohammed N, Dobeck JM, White RR, Socranscy SS, Skobe Z. Evaluation of the whole genome DNA-DNA hybridization technique to identify bacteria in histological sections of periradicular lesions. *J Endod.* 2004; 30(7): 518-22.
43. Chavéz de Paz L. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *J Endod.* 2007; 33: 652-62.
44. Chu FSC, Tsang P, Chow TW, Samaranayake LP. Identifications of cultivable microorganisms from primary endodontic infections with exposed and unexposed pulp space. *J Endod.* 2005; 31: 424-9.
45. Cintra LTA, Moraes IG, Bernabé PFE, Gomes Filho JE, Bramante CM, Garcia RB, Bernardinelli N. Evaluation of the tissue response to MTA and MBPC: microscopic analysis of implants in alveolar bone of rats. *J Endod.* 2006; 32: 556-9.

46. Cintra LTA. Análise histológica e radiográfica da influência de substâncias químicas-auxiliares e medicação intracanal no processo de reparo periapical em dentes de cães. [Tese]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2008.
47. Citrome GP, Kaminski EJ, Heuer MA. A comparative study of tooth apexification in the dog. J Endod. 1979; 5(10): 290-7.
48. Conrads G, Gharbia SE, Gulabivala K, Lampert F, Shah HN. The use of 16S rDNA direct PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. J Endod. 1997; 23(7): 433-8.
49. Conrads G, Citrom DM, Mutters R, Jang S, Goldstein EJ. *Fusobacterium canifelinum* sp. nov., from the oral cavity of cats and dogs. Syst Appl Microbiol. 2004; 27(4): 407-13.
50. Cortez DGN. Estudo in vitro da infiltração, densidade radiográfica e tempo operatório de técnicas de obturação endodônticas. [Dissertação]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2002.
51. Cunningham WT, Balekjian AY. Effect of temperature on collagen-dissolving ability of sodium hypochlorite endodontic irrigant. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1980; 49: 175-7.
52. Dametto FR, Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005; 99: 768-72.
53. Davis MS, Joseph SW, Bucher JF. Periapical and intracanal healing following incomplete root canal fillings in dogs. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1971; 31(5): 662-75.
54. De Deus QD. Topografia da cavidade pulpar. Contribuição ao seu estudo. [Tese]. Belo Horizonte: FO- UFMG; 1960.
55. De Deus QD. Frequency, location and direction of the lateral, secondary and accessory canals. J. Endod. 1975; 1: 361-6.
56. De Deus QD. Endodontia. Rio de Janeiro: Medsi; 1985. cap.7: 126-44.
57. De Rossi A, Bezerra da Silva LA, Leonardo MR, Rocha LB, Rossi MA. Effect of rotary or manual instrumentation, with or without a calcium hydroxide/1%

- chlorhexidine intracanal dressing, on the healing of experimentally induced chronic periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 99: 628-36.
58. Delany GM, Patterson SS, Miller CH, Newton CW. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. *Oral Sur.* 1982; 53: 518-23.
59. Dillon AR. The oral cavity. *In: Jones BD. Canine and feline gastroenterology.* Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1986. cap. 1.
60. Dixon CM, Rickert UG. Histologic verification of results of root canal therapy in experimental animals. *J Am Dent Assoc.* 1938; 25(11): 1781-803.
61. Dougherty WJ, Bae, KS, Watkins BJ, Baumgartner JC. Black-pigmented bacteria in coronal and apical segments of infected root canals. *J Endod.* 1998; 24(5): 356-8.
62. Dzink JL, Sheenan MT, Socransky SS. Proposal of three sub-species of *Fusobacterium nucleatum* Knorr 1922: *Fusobacterium nucleatum* subsp *nucleatum* subsp nov, comb nov; *Fusobacterium nucleatum* subsp *polymorphum* subsp nov, nom rev, comb nov; and *Fusobacterium nucleatum* subsp *vincentii* subsp nov, nom rev, comb nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1990; 40: 74-8.
63. Engström B, Frostell G. Experiences of bacteriological root canal control. *Acta Odontol Scandin,* 1964; 22: 43-69.
64. Ehrich DG, Brian JD, Walker WA. Sodium hypochlorite accident: inadvertent injection into the maxillary sinus. *J. Endod.* 1993; 19(4): 180-2.
65. Ercan E, Özekinci T, Atabul F, Gül K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. *J Endod;* 2004; 30: 84-7.
66. Esberard RM. Reparação apical e periapical dos dentes de cães portadores de lesões periapicais induzidas - influência da técnica. Estudo radiográfico e microscópico. [Tese – Livre Docência]. Araraquara: FOA/UNESP; 1992.
67. Evans R. Infecções orais e imunidade. *In: Nisengard RJ, Newman MG. Microbiologia oral e imunologia.* 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p. 1-6.

68. Fabricius L, Dahlén G, Holm SE, Möller ÅJR. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand Den J Res*. 1982; 90(3): 200-6.
69. Fabricius L, Dahlén G, Sundqvist G, Happonen RP, Möller ÅJR. Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. *Eur J Oral Sci*. 2006; 114: 278-85.
70. Fardal O, Turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J Am Dent Assoc*. 1986; 112: 863-9.
71. Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia A, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod*. 2001; 27(7): 452-5.
72. Ferreira FBA, Gomes BPFA, Gadê-Neto CR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Avaliação microbiológica de canais radiculares inoculados com endotoxina bacteriana. *Braz Oral Res*. 2001; 15: 139, B069.
73. Ferreira FBA, Rabang HRC, Gomes BPFA, Souza-Filho FJ. Microbiota dos canais radiculares de dentes selados e dentes abertos no modelo experimental cão. *Anais da 16ª JAFOA, Araraquara, SP, 2002a*.
74. Ferreira FBA, Gomes BPFA, Garcia RB, Gadê-Neto CR, Teixeira FB, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Avaliação microscópica de reações periapicais induzidas por endotoxinas. *Braz Oral Res*. 2002b; 16: 174, Pb039.
75. Ferreira FBA. Avaliação antimicrobiana do tratamento endodôntico em dentes de cães submetidos à contaminação oral e à aplicação de endotoxina bacteriana. [Tese]. Bauru: USP/FOB; 2003.
76. Ferreira FBA, Rabang HRC, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ, Gomes BPFA. Root canal of dogs' teeth with periapical lesions induced by two different methods. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 102: 564-70.
77. Fischer RG, Klinge B. Clinical and histological evaluation of ligature –induced periodontitis in the domestic ferret. *J Clin Periodontol*. 1994; 21: 230-9.
78. Fitzgerald RJ. Dental caries research in gnotobiotic animals. *Caries Res*. 1968; 2: 139-46.

79. Fouad AF, Walton RE, Rittman BR. Induced periapical lesions in ferret canines: histologic and radiographic evaluation. *Endod Dent Traumatol*. 1992; 8: 56-62.
80. Fournier D, Mouton C. Phenotypic characterization of human and animal biotypes within the species *Porphyromonas gingivalis*. *Res Microbiol*. 1993; 144(6): 435-44.
81. Fournier D, Mouton C, Lapierre P, Kato T, Okuda K, Ménar D. *Porphyromonas gulae* sp. Nov. An anaerobic, gram-negative coccobacillus from the gingival sulcus of various animal hosts. *Int J Evol Microbiol*. 2001; 51(Pt 3): 1179-89.
82. Freitas A; Rosa JE, Souza IF. Radiologia odontológica. 5ª. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2000. cap. 8, p. 114-131.
83. Friedman S, Torneck CD, Komorowski R, Ouzounian Z, Syrtash P, Kaufman A. In vivo model for assessing the functional efficacy of endodontic filling materials and techniques. *J Endod*. 1997; 23(9): 557-61.
84. Friedman S, Komorowski R, Maillet W, Klimaite R, Nguyen HQ, Torneck CD. In vivo resistance of coronally induced bacterial ingress by an experimental glass ionomer cement root canal sealer. *J Endod*. 2000; 26(1): 1-5.
85. Garberoglio R, Becce C. Smear layer removal by canal irrigants: a comparative scanning electron microscopic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994; 78: 359-67.
86. Gadê-Neto CR. Estudo microbiológico da bolsa periodontal e canais radiculares de dentes de cães com doença periodontal induzida. [Dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2000.
87. Gadê-Neto Cr, Gomes BPFA, Rabang HRC, Ferreira FBA; Baltieri PWQ; Souza Filho FJ. Avaliação de um método para estudo *in vivo* da microinfiltração coronária: estudo piloto em cães. *Braz Oral Res*. 2003; 17: 218.
88. Gadê-Neto CR. Influência do selamento coronário na obturação endodôntica. [Tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2004.
89. Garberoglio R, Becce C. Smear layer removal by root canal irrigants. A comparative scanning electron microscopic study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol*. 1994; 78(3): 359-67.

90. Gatot A, Arbelle J, Lieberman A, Yanai-Inbar I. Effects of sodium hypochlorite on soft tissues after its inadvertent injection beyond the root apex. J Endod. 1991; 17: 573-4.
91. Gatti JJ, Dobeck JM, Smith C, White RR, Socransky SS, Skobe Z. Bacteria of asymptomatic periradicular endodontic lesions identified by DNA-DNA hybridization, Endod Dent Traumatol. 2000; 16: 197-204.
92. Gernhardt CR, Eppendorf K, Kozlowski A, Brandt M. Toxicity of concentrated sodium hypochlorite used as endodontic irrigant. Int Endod J. 2004; 37: 272-80.
93. Goldstein EJC, Citron DM, Finegold SM. Role of anaerobic bacteria in bite-wound infections. Rev Infec Dis. 1984; 6(suppl 1): S177-S183.
94. Goldstein EJ. Bites wounds and infeccions. Clin Infect Dis. 1992; 14: 633-40.
95. Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. Int Endod J. 1994a; 27: 291-8.
96. Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Positive and negative associations between bacterial species in root canals. Microbios. 1994b; 80: 231-43.
97. Gomes BPFA. An investigation into the root canal microflora. [PhD Thesis]. Manchester – UK: University of Manchester; 1995.
98. Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. Int Endod J. 1996a; 29(2): 69-75.
99. Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Clinical significance of dental root canal microflora. J Dent. 1996b; 24(1-2): 47-55.
100. Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. Int Endod J. 1996c; 29(4): 235-41.
101. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. Int Endod J. 2001; 34: 424-28.

102. Gomes BPFA. Investigação dos microrganismos envolvidos na sintomatologia e no insucesso do tratamento endodôntico. [Tese - Livre Docência]. Piracicaba: UNICAMP-FOP, 2002.
103. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol*. 2004; 19: 71-6.
104. Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa ELR, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immunol*. 2005; 20(4): 211-5.
105. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, *et al.* *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 102: 247-53.
106. Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa ELR, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola* associated with primary infections and failed endodontic treatment. *J Endod*. 2006; 32: 937-40.
107. Gomes BPFA, Montagner F, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Polymerase Chain Reaction of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tanerella forsythia* in primary endodontic infections. *J Endod*. 2007; 33: 1049-52.
108. Gomes BPFA, Montagner F, Jacinto RC, Pinheiro ET, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. *Gemella morbillorum* in primary and secondary/persistent endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 105(4): 519-25.
109. Gomes Filho JE, Gomes BPFA, Zaia AA, Novaes PD, Souza Filho FJ. Glycol methacrylate: an alternative method for embedding subcutaneous implants. *J Endod*, 2001; 27: 266-8.
110. Gottlieb B, Schawartz AM, Stein G. Neue wege der biologischen kontrolle von wurzelbehandlungsmethoden . *Deutsche Zahnärztl Wchnschr*. 1929; 32:145.

111. Green CJ. Animal anesthesia. London: Laboratory Animals Ltd., 1979. cap.12, p. 203.
112. Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. J Periodontol. 1986; 57: 370-7.
113. Groisman M, Klinge B. Clinical and histological findings in ligature-induced experimental periodontitis in dogs. J Clin Periodontol. 1990; 17: 186-90.
114. Grossman LI, Melman B. Solution of pulp tissue by chemical agents. J. Am Dent Assoc. 1941. 28 :223.
115. Gursoy UK, Bostanci V, Kosger HH. Palatal mucosa necrosis because of accidental sodium hypochlorite injection instead of anaesthetic solution. Int Endod J. 2006; 39: 157-61.
116. Haapasalo M, Ranta H, Ranta K. Facultative Gram-negative enteric rods in persistent periapical infections. Acta Odontol Scandin.1983; 41: 19-22.
117. Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. J Clin Periodontol. 1997; 24: 767-76.
118. Harrison JW, Irrigation of the root canal system. Dent Clin North Am. 1984; 28: 797-808.
119. Harrison JW, Wagner GM, Henry C. A comparison of the antimicrobiol effectiveness of regular and fresh scent Clorox. J Endod. 1990; 16:328-30.
120. Harvey CE, Dubielzig, RR. Anatomy of the oral cavity in the dog and cat. *In*: Harvey CE. Veterinary Dentistry. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1985. cap. 2, p. 12.
121. Heling I, Steinberg D, Kenig S, Gavrilovich I, Sela MN, Friedman M. Efficacy of sustained-release device containing chlorhexidine and Ca(OH)₂ in preventing secondary infection of dentinal tubules. Int Endod J . 1992; 25: 20-4.
122. Hennessey TS. Some antibacterial properties of chlorhexidine. J Periodontol Res Suppl. 1973; 12: 61-7.
123. Hess, W, Keller O. Le tavole anatomiche di W. Hess. Itália: Edizioni Scientifiche Oral B, 1988.

124. Hill TJ. Experimental dental granulomas in dogs. J Am Dent Assoc. 1932; 19(8): 1389-98.
125. Holland R. Processo de reparo do coto pulpar e dos tecidos periapicais após biopulpectomia e obturação de canal com hidróxido de cálcio ou óxido de zinco e eugenol. Estudo histológico em dentes de cães. Tese-Livre Docência]. Araçatuba: FOA/UNESP; 1975.
126. Holland R, Souza V, Nery MJ, Mello W, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA. A histological study of the effect of calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth of dogs. J Br Endod Soc. 1979a; 12(1): 15-23.
127. Holland R, Nery MJ, Mello W, Souza V, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA. Root canal treatment with calcium hydroxide. I. Effect of overfilling and refilling. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1979b; 47(1): p. 87-92.
128. Holland R, Soares IJ, Soares IM. Influence of irrigation and intracanal dressing on the healing process of dogs' teeth with apical periodontitis. Endod Dent Traumatol. 1992; 8: 223-9.
129. Holland R, Souza V, Nery MJ, Mello W, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA, Dezan E Jr. R, Murata SS. Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium-hydroxide – containing sealers. J Endod. 2002; 28: 173-6.
130. Holland R, Otoboni Filho JA, Souza V, Nery MJ, Bernabé PFE, Dezan E Jr. A comparison of one versus two appointment endodontic therapy in dogs' teeth with apical periodontitis. J Endod. 2003; 29: 121-4.
131. Holland R, Sant'Anna A Jr., Souza V; Dezan E Jr., Otoboni Filho JA, Bernabé PFE, Nery MJ, Murata SS. Influence of apical patency and filling material on healing of dogs' teeth with vital pulp after root canal therapy. Braz Dent J. 2005; 16: 9-16.
132. Holland R, Mazuqueli L, Souza V; Murata SS; Dezan E Jr., Suzuki P. Influence of the type of vehicle and limit of obturation on apical and periapical tissue response in dogs' teeth after root canal filling with mineral trioxide aggregate. J Endod. 2007a; 33: 693-7.

133. Holland R, Ferreira LB, Souza V; Ottoboni Filho JA; Murata SS; Dezan E Jr. Reaction of the lateral periodontium of dogs' teeth to contaminated and noncontaminated perforations filled with mineral trioxide aggregate. J Endod. 2007b; 33:1192-7.
134. Hülsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation – literature review and case reports. Int Endod J. 2000; 33: 186-93.
135. Isermann GT, Kaminski EJ. Pulpal response to bacteria in the dog. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1979; 48(4): 353-7.
136. Jacinto RC, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. Oral Microbiol Immunol. 2003; 18: 285-92.
137. Jacinto RC. Relação da sintomatologia dolorosa com a presença de microrganismos e endotoxinas em canais radiculares infectados e susceptibilidade antimicrobiana de bactérias anaeróbias estritas isoladas. [Tese]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2006.
138. Jacinto RC, Montgner F, Signoretti FGC, Almeida GC, Gomes BPFA. Frequency, microbial interactions, and antimicrobial susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum* isolated from primary endodontic infections. J Endod. 2008; 34(12): 1551-6.
139. Jansen J, Pilot T. Predictability of probing depths in ligature-induced periodontal defects in beagle dogs. J Periodontal Res. 1981; 16: 372-8.
140. Jansen J. Artificial periodontal defects around incisor teeth of beagle dogs. J Periodontal Res., v.17, p. 210-218, 1982.
141. Jansen HJ, van der Hoeven JS. Protein degradation by *Prevotella intermedia* and *Actinomyces meyeri* supports the growth of non-protein cleaving oral bacteria in serum. J Clin Periodontol. 1997; 24(5): 346-53.
142. Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. J. Endod. 1994; 20(6): 276-8.

143. Jordan HV, Keyes PH. Aerobic, gram-positive, filamentous bacteria as etiologic agents of experimental periodontal disease in hamsters. Arch Oral Biol. 1964; 9: 401-14.
144. Jung IY, Choi BK, Kum KY, Roh BD, Lee SJ, Lee CY, Park DS. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. J Endod. 2000; 26(10): 599-604.
145. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposure of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1965; 20(3): 340-9.
146. Kantz WE, Henry CA. Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact chambers of non-vital teeth in man. Arch Oral Biol. 1974; 19(1): 91-6.
147. Kettering JD, Torabinejad M. Microbiologia e imunologia. In: Cohen S, Burns RC. Caminhos da polpa. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1994. cap. 13, p. 364.
148. Keyes PH, Fitzgerald RJ, Jordan HV, White CL. The effect of various drugs on caries and periodontal disease in albino hamsters. Adv F Res Dent Caries Prev. 1962; 1: 159-77.
149. Koenigs JF, Heller AI, Brilliant JD, Melfi RC, Driskell TD. Induced apical closure of permanent teeth in adult primates using a resorbable form of tricalcium phosphate ceramic. J Endod. 1975; 1(3): 102-6.
150. Kolberg R. Animal models point the way to human clinical trials. Science. 1992; 256(5058): 772-3.
151. Kornman KS, Siegrist B, Soslone WA, Nuki K. The predominant cultivable subgingival flora of beagle dogs following ligature placement and metronidazole therapy. J Periodontal Res. 1981; 16: 251-8.
152. Kowalesky J. Anatomia dental de cães (*Canis familiaris*) e gatos (*Felis catus*). Considerações cirúrgicas. [Dissertação]. São Paulo: FMVZ/USP; 2005.
153. Kumar, PS Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. J Clin Microbiol. 2005; 43: 3944-55.

154. La Scola B, Raoult D. Molecular identification of *Gemella* species from three patients with endocarditis. J Clin Microbiol. 1998; 36: 866-71.
155. Lana MA, Ribeiro Sobrinho AP, Stehing R, Garcia GD, Silva BK, Hanman JS, Nicoli JR, Carvalho MA, Farias L. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulps and their susceptibility *in vitro*. Oral Microbiol Immunol. 2001; 16: 100-5.
156. Laliberté M, Mayrand D. Characterization of black-pigmented *Bacteroides* strains isolated from animals. J Appl Bacteriol. 1983; 55: 247-52.
157. Lawson DD, Nixon GS, Noble HW, Weipers WL. Development and eruption of the canine dentition. Br Vet J. 1967; 123: 26-30.
158. Lebeau A. L'âdu chien et celui de l'homme essai de statistique sur la mortalité canine. Bull Acad Vét. 1953; 26: 229-32.
159. Leduc A, Grenier D, Mayrand D. Outer membrane-associated deoxyribonuclease activity of *Porphyromonas gingivalis*. Anaerobe. 1995; 1: 129-34.
160. Lee A. Animal models and vaccine development. Baill Clin Gastroenterol. 1995; 9(3): 615-32.
161. Leonardo RT. Avaliação microscópica da reação apical e periapical frente a dois cimentos obturadores de canais radiculares a base de hidróxido de cálcio (CRCS e Sealapex) em dentes de cães. [Dissertação]. Bauru: FOB/USP; 1992.
162. Leonardo MR, Bezerra da Silva LA, Leonardo RT, Utrilla LS, Assed. Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and periapical lesions. J Endod. 1993; 19(7): 348-52.
163. Leonardo MR, Almeida WA, Ito IY, Bezerra da Silva LA. Radiographic and microbiologic evaluation of posttreatment apical and periapical repair of root canals of dogs` teeth with experimentally induced chronic lesion. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1994; 78(2): 232-8.
164. Leonardo MR, Almeida WA, Bezerra da Silva LA, Utrilla LS. Histopathological observations of periapical repair in teeth with radiolucent areas submitted to two different methods of root canal treatment. J Endod. 1995; 21(3): 137-41.
165. Levy BM. Animal analogues for the study of dental and oral diseases. Dev Biol Standard. 1980; 45:51-9.

166. Lin WI, McCulloch CA, Cho MI. Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. *Anat Rec.* 1994; 240: 492-506.
167. Lomçali G, Sen BH, Çankaya H. Scanning electron microscopic observations of apical root surfaces of teeth with apical periodontitis. *Endod Dent Traumatol.* 1996; 12: 70-76.
168. Marsh P, Martin M. *Oral Microbiology*. 3rd ed. London, UK: Chapman & Hall; 1992.
169. Martinho FC. Análise microbiológica, quantificação de endotoxinas de dentes com infecções endodônticas primárias e suscetibilidade antimicrobiana. [Dissertação]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2007.
170. Masson E, Hennes PR, Calas PL. Apical root canal anatomy in the dog. *Endod Dent Traumatol.* 1992; 8: 109-12.
171. Massone F. Técnicas anestésicas em cães. *In: Massone F. Anestesiologia veterinária: farmacologia e técnicas*. 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.108-24.
172. Matsumiya S, Kitamura M. Histo-pathological and histo-bacteriological studies of the relation between the condition of sterilization of the interior of the root canal and the healing process of periapical tissues in experimentally infected root canal treatment. *Bull Tokyo Dent Coll.* 1960; 1(1): 1-19.
173. Matusow RJ. Endodontic cellulites “flare-up”. Case report. *Aust Den J.* 1995; 40: 36-8.
174. McCormick JE, Weine FS, Maggio JD. Tissue pH of developing periapical lesions in dogs. *J Endod.* 1983; 9(2): 47-51.
175. Miller WD. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. *Dent Cosmos.* 1894; 36: 505-28.
176. Mims C, Dimmock N, Nash A, Stephen J. *Mims’ pathogenesis of infectious disease*. New York: Academic Press; 1995.
177. Misirligil A, Tuncer I. Oral bacterial flora of dogs. *Ankara Üniv. Dis. Hek. Fak. Derg.* 1990; 17(1): 79-82.

178. Molander A, Relf C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1998; 31(1): 1-7.
179. Möller AJR. Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth: methodological studies. [Akademiförlaget]. Göteborg-Sweden: 1966.
180. Moraes SR, Siqueira JF Jr., Colombo AP, Roças IN, Ferreira MCS, Domingues RMCP. Comparison of the effectiveness of bacterial culture, 16S rDNA direct polymerase chain reaction, and checkerboard DNA-DNA hybridization for detection of *Fusobacterium nucleatum* in endodontic infections. *J Endod.* 2002; 28(2): 86-9.
181. Moreland AF, Glaser C. Evaluation of ketamine, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam anesthesia in the ferret. *Lab Anim Sci.* 1985; 35(3): 287-90.
182. Morse DR, Furst ML, Belott RM, Lefkowitz RD, Spritzer IB, Sideman BH. Infectious flare-ups and serious sequelae following endodontic treatment: a prospective randomized trial on efficacy of antibiotic prophylaxis in cases of asymptomatic pulpal-periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1987; 64(1): 96-109.
183. Munsun MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman, Wade. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res.* 2002; 81: 761-6.
184. Naenni N, Thomaz K, Zenhder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used as potential endodontic irrigants. *J Endod.* 2004; 3: 785-7.
185. Nakamura Y, Hammarström L, Matsumoto K, Lyngstadaas SP. The induction of reparative dentine by enamel proteins. *Int Endod J.* 2002; 35(5): 407-17.
186. Nair R. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod.* 1987; 1: 29-39.
187. Nieves MA., Vahle J, Ackermann M, Howard , Dietz AB, Carpenter SL, Cheville N. Bacterial isolates from plaque and from blood during and after routine dental procedures in dogs. *Vet Surg.* 1997; 26(1): 26-32.
188. Nisengard RJ, Goodman D, Schein B. Infecções periapicais. *In: Nisengard R, Newman MG. Microbiologia oral e imunologia.* 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1997. cap. 30, p. 336-41.

189. Ogawa AT, Souza TACB, Uzeda M, Jankevicius JV, Jankevicius SI. Characterization of proteolytic activities of *Fusobacterium nucleatum*. J Endod. 2006; 32: 521-3.
190. Okamoto T. Estudo histoquímico da reatividade do tecido conjuntivo alveolar após extrações dentais. [Tese]. Araçatuba: FOA/UNESP: 1964.
191. Önçag Ö, Hosgör M, Hilmioglu S, Zekioglu O, Eronat C, Burhanoglu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. Int Endod J. 2003; 36(6): 423-32.
192. Orbán B. The problem of root canal treatment. J Am Dent Assoc. 1932; 19: 1384-8.
193. Orbán B. Action of paraformaldehyde on dental pulp. J Dent Res. 1933; 13(3): 215-6.
194. Östby BN. The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. Acta Odontol Scand. 1961; 19(3-4): 323-53.
195. Otoboni Filho JA. Processo de reparo de dentes de cães com lesão periapical após tratamento endodôntico em uma ou duas sessões. Influência do tempo de curativo de demora e do tipo de material obturador. [Tese Livre Docência] Araçatuba: UNESP/FOA, 2000.
196. Page RC, Schroeder HE. Periodontitis in man and other animals. A comparative review. New York: Karger, 1982, p.127-158.
197. Panzarini SR. Tratamento de dentes com lesão periapical crônica. Influência de diferentes tipos de curativo de demora e material obturador de canal. Estudo histológico em cães. [Dissertação]. Araçatuba: FOA/UNESP: 1996.
198. Papapanou PN, Madianos PN, Dahlén G, Sandros J. "Checkerboard" versus culture: a comparison between two methods for identification of subgingival microbiota. Eur J Oral Sci. 1997; 105: 389-96.
199. Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissues. J Endod. 1985; 11: 525-8.
200. Peters LB, Wesselink PR, van Winkelhoff AJ. Combinations of bacterial species in endodontic infections. Int Endod J. 2002; 35: 698-702.

201. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J*. 2003a; 36(1): 1-11.
202. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol*, 2003b; 18(2): 100-3.
203. Pitt Ford TR. The radiographic detection of periapical lesions in dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1984; 57(6): 662-7.
204. Pitts DL, Williams BL, Morton TH Jr. Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. *J Endod*. 1982; 8(1): 10-8.
205. Pontes F, Pontes H, Adachi P, Almeida D, Pinto D Jr. Gingival and bone necrosis caused by accidental sodium hypochlorite injection instead of anaesthetic solution. *Int Endod J*. 2008; 41: 267-70.
206. Rabang, HRC, Ferreira FBA, Gadê-Neto CR, Gomes BPFA, Souza-Filho FJ. Análise radiográfica de dois métodos de indução de reações periapicais em dentes de cães. *Braz Oral Res*. 2002; 16: 219, Pc033.
207. Rabang HRC. Análise microbiológica de canais radiculares e radiográfica de dentes de cães com lesão periapical induzida. [Dissertação]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2003.
208. Rabang HRC, Pinheiro ET, Gadê Neto CR, Ferreira FBA, Quadros I, Gomes BPFA, Souza Filho FJ. Análise microbiológica de canais radiculares e radiográfica de dentes de cães com lesão periapical induzida. *Braz Oral Res*. 2003; 17: 220.
209. Ranta K, Haapasalo M, Ranta H. Monoinfection of root canal with *Pseudomonas aeruginosa*. *Endod Dent Traumatol*. 1988; 4: 269-72.
210. Rayan GM, Downard D, Cahill S, Flournoy DJ. A comparison of human and animal mouth flora. *J Okla State Med Assoc*. 1991; 84: 510-5.
211. Renvert S, Wikström M, Mugerab M, Claffey N. Histological and microbiological aspects of ligature-induced periodontitis in beagle dogs. *J Clin Periodontol*. 1996; 23(4): 310-9.

212. Roças IN, Siqueira JF Jr., Santos KRN, Coelho AMA. "Red complex" (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) in endodontic infections: a molecular approach. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001; 91: 468-71.
213. Roças IN, Hülsmann M, Siqueira JF Jr. Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. J Endod. 2008a; 34: 926-31.
214. Roças IN, Siqueira JF Jr. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. J Clin Microbiol. 2008b; 46: 3599-606.
215. Rodrigues RR. Análise radiográfica da região de furca, após a confecção e contaminação de trepanações experimentais em dentes de cães seladas com diferentes materiais. [Dissertação]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2000.
216. Rølla G, Melsen B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. J Dent Res. 1975; 54: 57-62.
217. Roush JK, Howard PE, Wilson JW. Normal blood supply to the canine mandible and mandibular teeth. Am J Vet Res. 1989; 50(6): 904-7.
218. Rowe AHR. Effect of root filling materials on the periapical tissues. Br Dent J. 1967; 122: 98-102.
219. Rowe AHR, Binnie WH. The incidence and location of micro-organisms following endodontic treatment. Br Dent J. 1977; 141: 91-5.
220. Rowe AHR. Problems of intra-canal testing of endodontic materials. Int Endod J. 1980; 13: 96-103.
221. Rutala WA, Weber DJ. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. Clin Microbiol Rev. 1997; 10: 597-610.
222. Sabala CL, Powell SE. Sodium hypochlorite injection into periapical tissues. J Endod. 1989; 15(10): 490-2.
223. Salman MA, Quinn F, Dermody J, Hussey D, Claffey N. Histological evaluation of repair using a bioresorbable membrane beneath a resin-modified glass ionomer after mechanical furcation perforation in dogs' teeth. J Endod. 1999; 25(3): 181-6.

224. Santa Cecília M. Avaliação de algumas propriedades físico-químicas e biológicas de uma solução clorada experimental, para irrigação de canais radiculares. [Tese]. Bauru: FOB/USP; 1999.
225. Saphir DA, Carter GR. Gingival flora of the dog with special reference to bacteria associated with bites. J Clin Microbiol. 1976; 3(3): 344-9.
226. Sassone LM, Fidel RAS, Fidel SR, Dias M, Hirata Junior R. Antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine using a contact test. Braz Dent J. 2003a; 14(2): 99-102.
227. Sassone LM, Fidel RAS, Fidel SR, Vieira M, Hirata R Jr. The influence of organic load on the antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine *in vitro*. Int Endod J. 2003b; 36(12): 848-52.
228. Sassone LM, Fidel R, Figueiredo L, Fidel S, Faveri M, Feres M. Evaluation of the microbiota of primary endodontic infections using hybridization. Oral Microbiol Immunol. 2007; 22: 390-7.
229. Sassone LM, Fidel RA, Faveri M, Guerra R, Figueiredo L, Fidel SR, Feres M. A microbiological profile of symptomatic teeth with primary endodontic infections. J Endod. 2008; 34(5): 541-5.
230. Schneck GW. Caries in the dog. J Am Vet Med Assoc. 1967; 150(10): 1142-3.
231. Schwartz SF, Foster JK. Roentgenographic interpretation of experimentally produced bony lesions. Part 1. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1971; 32: 606-12.
232. Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. J Endod. 2006; 32: 173-7.
233. Seltzer S, Turkenkoff S, Vito A, Green D, Bender IB. A histologic evaluation of periapical repair following positive and negative root canal cultures. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1964; 17(4): 507-32.
234. Seltzer S. Endodontology: biologic considerations in endodontic procedures. New York: McGraw Hill Book; 1971.
235. Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubes by SEM. Endo Dent Traumatol. 1995; 11: 6-9.

236. Senia ES, Marraro RV, Mitchell JL. Rapid sterilization of gutta-percha cones with 5.25 per cent sodium hypochlorite and hydrogen peroxide versus normal saline solution. J Endod. 1975; 1: 136-40.
237. Senia ES, Marshall FJ, Rosen S. The solvent action of sodium hypochlorite on pulp tissue of extracted teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1971; 31: 96-103
238. Serene TP, Anderson DL. Isolation of *Mycoplasma* from human root canals. J Dent Res. 1967; 49: 395-9.
239. Serper A, Özbek M, Çalt S. Accidental sodium hypochlorite-induced skin injury during endodontic treatment. J Endod. 2004; 30(3): 180-2.
240. Shabestari L, Taylor GN, Angus W. Dental eruption pattern of the beagle. J Dent Res. 1967; 46(1): 276-8.
241. Shoji S, Nakamura M, Horiuchi H. Histopathological changes in dental pulps irradiated by CO₂ laser: a preliminary report on laser pulpotomy. J Endod. 1985; 11(9): 379-84.
242. Silveira FF. Efeito do tempo de ação do “curativo de demora” à base de hidróxido de cálcio, utilizado em canais radiculares de dentes de cães com lesão periapical crônica induzida. Análise histológica e microbiológica. [Dissertação]. Araraquara: FOA/UNESP; 1997.
243. Sinai I, Seltzer S, Soltanoff W, Goldenberg A, Bender IB. Biologic aspects of endodontics II. Periapical tissue reactions to pulp extirpation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1967; 23(5): 664-79.
244. Siqueira Jr. JF, Uzeda M, Fonseca MEF. A scanning electron microscopic evaluation of *in vitro* dentinal tubes penetration by selected anaerobic bacteria. J Endod. 1996; 22: 308-10.
245. Siqueira Jr. JF. Microbiologia das infecções endodônticas. In: Siqueira Jr. JF. Tratamento das infecções endodônticas. Rio de Janeiro: MEDSI; 1997. p. 31-60.
246. Siqueira Jr. JF, Araújo MCP, Garcia PF, Fraga RC, Sabóia Dantas CJ. Histological evaluation of the effectiveness of five instrumentation techniques for cleaning the apical third of root canals. J Endod. 1997; 23: 499-502.

247. Siqueira Jr. JF, Batista MDM, Fraga RC. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented Gram-negative anaerobes and facultative bacteria. J Endod. 1998; 24: 414-6.
248. Siqueira Jr. JF, Lopes, HP. Microbiologia endodôntica. In: LOPES, HP; Siqueira Junior JF. Endodontia: biologia e técnica. Rio de Janeiro: MEDSI; 1999. p. 185-216.
249. Siqueira Jr. JF, Rôças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Endod. 2000; 89(6): 744-8.
250. Siqueira Jr. JF, Rôças IN, Favieri A, Oliveira JCM, Santos KRN. Polymerase chain reaction detection of *Treponema denticola* in endodontic infections within root canals. Int Endod J. 2001a; 34(4): 280-4.
251. Siqueira Jr. JF, Rôças IN, Oliveira JCM, Santos KRN. Detection of putative oral pathogens in acute periradicular abscesses by 16S rDNA directed PCR. J Endod. 2001b; 27: 164-7.
252. Siqueira Jr. JF, Rôças IN, Oliveira JCM, Santos KRN. Molecular detection of black-pigmented bacteria infections of endodontic origin. J Endod. 2001c; 27(9): 263-6.
253. Siqueira Jr. JF, Rôças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001d; 92: 451-7.
254. Siqueira Jr. JF, Rôças IN, Uzeda M, Colombo AP, SANTOS KRN. Comparison of 16S rDNA-based PCR and checkerboard DNA-DNA hybridization for detection of selected endodontic pathogens. J Med Microbiol. 2002; 51: 1090-6.
255. Siqueira Jr. JF, Rôças IN. *Campylobacter gracilis* and *Campylobacter rectus* in primary endodontic infections. Int Endod J. 2003a; 36(3): 174-80.
256. Siqueira Jr. JF, Rôças IN. *Treponema socranskii* in primary endodontic infections as detected by nested PCR. J Endod. 2003b; 29: 244-7.
257. Siqueira Jr. JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction detection of *Propionibacterium propionicus* and *Actinomyces radientis* in primary and

- persistent endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003c; 96: 215-22.
258. Siqueira Jr. JF, Rôças IN. Nested PCR detection of *Centipeda periodontii* in primary endodontic infections. J Endod. 2004; 30: 135-7.
259. Siqueira Jr. JF, Rôças IN. Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections. J Clin Microbiol. 2005; 43: 3314-9.
260. Siqueira JF Jr, Paiva SSM, Rôças IN. Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol. J Endod. 2007; 33(5): 541-47.
261. Siqueira JF J. On the issue of uncultivated bacteria and dead cell detection by molecular methods: reply to Dr. Nair's commentary. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008; 105: 5-8.
262. Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo ENJ. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. Int Endod J. 1997; 30: 91-5.
263. Sjögren U, Fidgor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. Int Endod J. 1997; 30: 297-306.
264. Snyder DE, Seltzer S, Moodnik R. Effects of N₂ in experimental endodontic therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1966; 21(5): 635-56.
265. Soares IJ, Holland R, Soares IML. Comportamento dos tecidos periapicais após tratamento endodôntico em uma ou duas sessões – influência do cimento obturador. Rev Bras Odontol. 1990a; XLVII(2): 34-41.
266. Soares I, Goldberg F, Massone EJ, Soares IM. Periapical tissue response to two calcium hydroxide-containing endodontic sealers. J Endod. 1990b; 16(4): 166-9.
267. Soares JA. Estudo microbiológico dos canais radiculares, histopatológico e histobacteriológico dos tecidos apicais e periapicais, em função do preparo biomecânico e de dois curativos de demora à base de hidróxido de cálcio, utilizados em dois períodos de avaliação, no tratamento endodôntico de dentes

- de cães, com reação periapical crônica induzida. [Dissertação]. Araraquara: UNESP/FOA, 1999.
268. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques*. 1994; 17(4): 788-92.
 269. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Junior RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998; 25(2): 134-44.
 270. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG, Goodson JM. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol*. 2004; 19: 352-62.
 271. Soriano de Souza CA, Teles RP, Souto R, Chaves MAE, Colombo APV. Endodontic therapy associated with calcium hydroxide as an intracanal dressing: microbiologic evaluation by the checkerboard DNA-DNA hybridization technique. *J Endod*. 2005; 31(2): 79-83.
 272. Sousa ELR. Estudo bacteriológico de canais radiculares associados a abscessos periapicais. [Dissertação]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2000.
 273. Souza V, Bernabé PFE, Holland R, Nery MJ, Mello W, Ottoboni Filho JA. Tratamento cirúrgico de dentes com lesões periapicais. *Rev Bras Odontol*. 1989; 46(2): 39-46.
 274. Souza-Filho FJ, Benatti O, Almeida OP. Influence of the enlargement of the apical foramen in periapical repair of contaminated teeth of dog. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1987; 64(4): 480-4.
 275. Souza-Filho FJ, Valdrighi L, Bernardinelli N. Influência do nível da obturação e alargamento do forame apical no processo de reparo tecidual. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 1996; 50(2): 175-7.
 276. Souza Filho FJ, Teixeira FB. Uso do Microscópio em Endodontia. *In: LOPES, HP; Siqueira Junior JF. Endodontia: biologia e técnica*. Rio de Janeiro: MEDSI, 1999. p. 633-8.
 277. Souza-Filho FJ, Teixeira FB. O emprego da microscopia ótica em endodontia. *In: Vanzillotta PS, Gonçalves AR (Coord.) Odontologia integrada: atualização multidisciplinar para o clínico e o especialista*. Rio de Janeiro: Pedro Primeiro, 2001. cap. 10, p. 279-287.

278. Stepanović S., Dimitrijević V, Vuković D, Dakić I, Savić B, Svabic-Vlahović M. *Staphylococcus sciuri* as a part of skin, nasal and oral flora in healthy dogs. Vet Microbiol. 2001; 82(2): 177-85.
279. Strömberg T. Wound healing after total pulpectomy in dogs. Odontol Revy. 1969; 20: 147-163.
280. Su RY. The effect of berberine in sterilizing infective root canal of deciduous teeth. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 1992; 27(5): 302-5, 319.
281. Sunde PT, Tronstad L, Eribe ER, Lind PO, Olsen I. Assessment of periradicular microbiota by DNA-DNA hybridization. Endod Dent Traumatol. 2000; 16: 191-6.
282. Sundqvist G. Bacteriologic studies of necrotic dental pulps. [Odontological Dissertation n° 7]. Umeå-Sweden: University of Umeå; 1976.
283. Sundqvist GK, Eckerbom MI, Larsson AP, Sjögren UT. Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. Infect Immun. 1979; 25(2): 685-93.
284. Sundqvist G. Carlsson J, Herrmann B, Tánvik A. Degradation of human immunoglobulins G and Mand complement factors C3 and C5 by black pigmented *Bacteroides*. J Med Microbiol. 1985; 19: 85-94
285. Sundqvist G, Johansson E, Sjögren U. Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. J Endod. 1989; 15:13-9.
286. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. J Endod. 1992; 18 (9): 427-30.
287. Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1994; 78 (4): 522-30.
288. Sundqvist G, Fidgor D, Sjögren U. Microbiology analyses of teeth with endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1998; 85: 86-93.
289. Syed SA, Loesche WJ. Survival of human dental plaque flora in various transport media. Appl Microbiol. 1972; 24(4): 638-44.
290. Takahashi K, Kishi Y, Kim S. A scanning electron microscope study of the blood vessels of dog pulp using corrosion resin casts. J Endod. 1982; 8(3): 131-5.

291. Takahashi K. Vascular architecture of dog pulp using corrosion resin cast examined under a scanning electron microrcope. J Dent Res. 1985; 64(Spec. Iss): 579-84.
292. Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. Int Endod J. 1998; 31: 311-25.
293. Tani-Ishii N, Wang CY, Tanner A, Stashenko P. Changes in root canal microbiota during the development of rats periapical lesions. Oral Microbiol Immunol. 1994; 9(3): 129-35.
294. Tanomaru-Filho M. Comportamento dos tecidos apicais e periapicais de dentes de cães portadores de reação periapical crônica em função da técnica de neutralização do conteúdo séptico-tóxico e do cimento obturador empregado no tratamento endodôntico. Avaliação radiográfica e histopatológica. [Tese]. Araraquara: FOA/UNESP; 1996.
295. Tanomaru-Filho M, Poliseli-Neto A, Leonardo MR, Silva LAB, Tanomaru JMG, Ito IY. Methods of experimental induction of periapical inflammation. Microbiological and radiographic evaluation. Int Endod J. 2005; 38(7): 477-82.
296. Tanomaru JMG, Leonardo MR, Tanomaru-Filho M, da Silva LAB, Ito IY. Microbial distribution in the root canal system after periapical lesion induction using different methods. Braz Dent J. 2008; 19(2): 124-9.
297. Tanomaru JMG, Leonardo MR, Poliseli-Neto A, Tanomaru-Filho M, Silva LAB. Histopathological evaluation of different methods of experimental induction of periapical periodontitis. 2008; 19(3): 238-44
298. Thilo BE, Baehni P, Holz J. Dark-field observation of the bacterial distribution in root canals following pulp necrosis. J Endod. 1986; 12: 202-5.
299. Tomazinho LF, Avila-Campos MJ. Detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in chronic endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007; 103: 285-8.
300. Torneck CD. Reation of rat connective tissue to polyethylene tube implants. Part I. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1966; 21: 379-87.

301. Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. Part II. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1967; 24: 674-83.
302. Torneck CD, Smith JS. Biologic effects of endodontic procedures on developing incisor teeth. I. Effect of partial and total pulp removal. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1970; 30(2): 258-66.
303. Torneck CD, Smith JS, Grindall P. Biologic effects of endodontic procedures on developing incisor teeth. IV. Effect of debridement procedures and calcium hydroxide-canphorated parachlorophenol paste in the treatment of experimentally induced pulp and periapical disease Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1973; 35(4): 541-4.
304. Tronstad L, Sunde PT. The evolving new understanding of endodontic infections. Endod Topics. 2003; 6: 57-77.
305. Uzeda M. Microbiologia oral: etiologia da cárie, doença periodontal e infecções endodônticas. Rio de Janeiro: MEDSI, 2002.
306. Valdrighi L. Influência dos “espaços vazios” nos resultados dos tratamentos de canais radiculares. Avaliação radiográfica e histopatológica (Estudo experimental em cães). [Tese-Livre Docência]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 1976.
307. Vianna ME, Gomes BPFA, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004; 97: 79-84.
308. Vianna ME. Microbiologia e tratamento das infecções endodônticas. [Tese] Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2006.
309. Vianna ME, Horz H-P, Gomes BPFA, Conrads G. Identification and quantification of *Archea* in primary endodontic infections. J Clin Microbiol. 2006a; 44(4): 1274-82.
310. Vianna ME, Conrads G, Gomes BPFA, Horz H-P. *In vivo* evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. Int Endod J. 2006b; 39(6): 485-492.
311. Vianna ME, Horz H-P, Conrads G, Feres M, Gomes BPFA. Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. Oral Microbiol Immunol. 2008; 23: 282-90.

312. Vidair RV, Butcher EO. Regeneration of tissue into the pulp canal of monkey's teeth. J Dent Res. 1955; 10(4): 163-6 .
313. Vieira S, Hossne WS. Pesquisa médica: a ética e a metodologia. São Paulo: Pioneira, 1998. cap. 2, p. 38-40.
314. Villanueva LECP. *Fusobacterium nucleatum* in endodontic flare-ups. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002; 93: 179-83.
315. Wade WG; *et al.* Molecular detection of novel anaerobic species in dentoalveolar abscesses. Clin Infect Dis. 1997; 25(Suppl. 2): 235-6.
316. Walker AA. Definitive and dependable therapy for pulpless teeth. J Amer Assoc. 1936; 23(2): 1418-25.
317. Wall-Manning GM, Sissons CH, Anderson SA, Lee M. Checkerboard DNA-DNA Hybridization technology focused on analysis of Gram-positive cariogenic bacteria. J Microbiol Methods. 2002; 51: 301-311.
318. Waltimo TM, Orstavik D, Siren EK, Haapasalo MP. *In vitro* susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. Int Endod J. 1999; 32 :421-9.
319. Wang Cs, Arnold RR, Trope M, Teixeira FB. Clinical efficiency of 2% chlorhexidine gel in reducing intranal bacteria. J Endod. 2007; 33: 1283-1289.
320. Weaver ME, Sorensen FM, Jump EB. The miniature pig as an experimental animal in dental research. Arch Oral Biol. 1962; 7: 17-24.
321. West NM, West JE, Revere JH, England MC. A new approach to the use of silver cones: the effect of negatively charged Teflon: a preliminary study. J Endod. 1979; 5(7): 208-13.
322. West JD, Roane JB. Limpeza e modelagem do sistema de canais radiculares. *In*: Cohen S. & Burns RC. Caminhos da polpa. 7^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000 cap.8: 191.
323. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. J Endod. 1997; 1: 168-71.
324. Wikström M, Renvert S, Johnsson T, Dahlén G. Microbial associations in periodontitis sites before and after treatment. Oral Microbiol Immunol. 1993; 8(4): 213-8.

325. Wittgow WC Jr, Sabiston CB Jr. Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. J Endod. 1975; 1(5): 168-71.
326. Witton R, Brennan PA. Severe tissue damage and neurological deficit following extravasation of sodium hypochlorite solution during routine endodontic treatment. Br Dent J. 2005; 198: 749-50.
327. Wu M, Wesselink PR. Efficacy of three techniques in cleaning the apical portion of curved canals. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1995; 79: 492-6.
328. Xia T, Baumgartner C. Occurrence of *Actinomices* in infections of endodontic origin. J endod. 2003; 29: 549-52.
329. Xu J, Jiang Y, Dong Q. Experimental study on supraeruption of the unopposed miniature pig molars. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 1997; 32(5): 276-8.
330. Yamashita JC. Avaliação, por microscopia eletrônica de varredura, da capacidade de limpeza de algumas soluções irrigadoras empregadas em Endodontia. [Tese] Araraquara: FOA/UNESP; 2000.
331. Yankell SL. Oral disease in laboratory animals: animal models of human dental disease. In: Harvey CE. Veterinary Dentistry. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1985. Cap. 19.
332. Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Philips E, Trope M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. J Endod. 1995; 21: 513-5.
333. Yoshida M, Fukushima H, Yamamoto K, Ogawa K, Toda T, Sagawa H. Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canals of teeth with periapical pathosis. J Endod 1987; 13(1): 24-8.
334. Zaman A, Safavi K, Spångberg, I. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003; 96: 578-81.
335. Zambon JJ, Haraszthy, VI. The laboratory diagnosis of periodontal infections. Periodontol 2000. 1995; 7: 69-82.
336. Zavistoski J, Dzink J, Onderdonk A, Bartlett J. Quantitative bacteriology of endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1980; 49(2): 171-4.

ANEXO 1 – Certificado de Aprovação do Comitê de Ética na Experimentação Animal.



INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNICAMP

CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 380-2, sobre "ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DOS EFEITOS DA AMPLIAÇÃO DO DIÂMETRO DO FORAME APICAL E PREPARO QUÍMICO MECÂNICO EM DENTES DE CÃO COM NECROSE PULPAR INDUZIDA" sob a responsabilidade de HELENA ROSA CAMPOS RABANG E BRENDA PAULA DE ALMEIDA FIGUEIREDO GOMES está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 1/1.

Campinas, 07 de junho de 2002.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 380-2, entitled "ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DOS EFEITOS DA AMPLIAÇÃO DO DIÂMETRO DO FORAME APICAL E PREPARO QUÍMICO MECÂNICO EM DENTES DE CÃO COM NECROSE PULPAR INDUZIDA", is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas – UNICAMP) on 1/1.

Campinas 07 de junho de 2002.

Alba R.M. Souza Brito
Prof(a) Dr(a) Alba R.M. Souza Brito
Presidente – CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ
CEP: 13 081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEFONE (019) 788 7126
FAX (019) 289.3124

APÊNDICE 1 – Meio de Transporte.

1.1. RTF – *Reduced Transport Fluid* *

1.1.1. Descrição

É um meio não seletivo de transporte e estocagem. Com exceção de 0,02% de dithiothreitol (DTT), que é adicionado ao meio como um agente redutor, não há nenhum outro componente que propicie o crescimento bacteriano. A adição de uma pequena concentração de EDTA (0,1M) ao RTF promove uma distribuição mais uniforme das células bacterianas. Como EDTA atua como um agente quelante, sua incorporação ao RTF é útil por se ligar a cátions bivalentes, como Ca^{+2} , que estão presentes em altas concentrações na placa e contribuem para a agregação da placa bacteriana.

RTF não contém agentes bacteriostáticos que poderiam afetar a multiplicação de bactérias na amostra. Conseqüentemente, crescimento pode ocorrer neste meio, se a amostra contiver nutrientes que permitam a multiplicação por período limitado. Contudo, não foi comprovado crescimento de microrganismos da placa neste meio. Embora sua eficiência como um meio de estoque varie de acordo com a natureza da amostra, o desempenho do RTF é melhor do que outros meios já testados. A suplementação do meio com Dithiothreitol (DTT) o torna mais resistente à oxidação em condições de aerobiose. A viabilidade dos organismos pode ser mantida neste meio quando congelado. A adição de Resazurin ao RTF indica se houve ou não oxidação durante o experimento.

*Syed AS, Loesche WJ. Survival of human dental plaque flora in various transport media. Appl Microbiol 1972; **24**: 638-644

1.1.2. Fórmula

<u>Solução 1 (Estoque)</u>	
K ₂ HPO ₄	0,6g
H ₂ O	100mL
Solução 2 (Estoque)	
NaCl	1,2g
KH ₂ PO ₄	0,6g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,2g
Mg SO ₄	0,25g
H ₂ O	100mL
RTF	100mL
Solução 1	7,5mL
Solução 2	7,5mL
EDTA 0,1M (0,3722g/10mL)	1mL
Na ₂ CO ₃ 8% (0,4g/5mL)	0,5mL
Dithiothreitol 1% (0,05g/5mL)	2mL
Resazurin 0,1% (0,01g/10mL)	0,1mL
<u>H₂O</u>	81,4mL
pH: 7 ± 0,2	

APÊNDICE 2 – Meios de Cultura.

2.1. *Fastidious Anaerobe Ágar* (FAA) – LAB M (Bury, UK)

2.1.1. Descrição

Meio capaz de favorecer o crescimento dos anaeróbios isolados clinicamente. As peptonas são incorporadas para a máxima estimulação de crescimento. Amido e bicarbonato atuam como agentes desintoxicantes, enquanto a hemina favorece a produção de pigmento nos “*Bacteroides*” produtores de pigmento preto. Agentes específicos de estimulação de crescimento: cisteína para *Fusobacterium* spp, *Propionibacterium acnes*, e *Bacteróides fragilis*; arginina para *Eubacterium* spp.; pirofosfato solúvel para *Porphyromonas asaccharolytica*. Piruvato contribui para a neutralização do peróxido de hidrogênio e pode ser também utilizado pela *Veillonella* spp. como fonte de energia. Vitamina K e succinato de sódio fornecem fatores essenciais de crescimento para alguns anaeróbios, como também 0,1% de glicose. O nível baixo de glicose impede a produção de níveis elevados de ácidos e álcoois que podem inibir o crescimento bacteriano.

2.1.2. Preparo

Adicionar 23,0 g do pó em 500 mL de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min. e depois agitada. É esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 min. e resfriada a 47 °C. Então adicionar assepticamente 5% de sangue desfibrinado de carneiro, misturar bem e distribuir nas placas de petri.

2.1.3. Aparência

Vermelho devido à adição de sangue. O meio fica escuro (reduzido) mais tarde devido à adição de redutores.

2.1.4. Armazenagem do meio preparado

Placas: até 7 dias a 4 °C fora do alcance da luz.

2.1.5. Inoculação

Plaqueamento na superfície da placa.

2.1.6. Incubação

37 °C anaerobicamente (80% H₂, 10% N₂, 10% CO₂ , por períodos de 48 horas e 7 dias).

2.1.7. Fórmula

	g/L
Mistura de peptonas	23,0
Cloreto de sódio	5,0
Amido solúvel	1,0
Ágar nº 2	12,0
Glicose	0,4
Piruvato de sódio	1,0
HCL cisteína monoidratada	1,0
Hemina	0,5
Vitamina K	0,001
L-arginina	1,0
Pirofosfato solúvel	0,25
Succinato de sódio	0,5
pH: 7,4 ± 0,2	

Este meio pode ser enriquecido através da adição de Vitamina K₁ e Hemina:

2.2. Solução Vitamina K₁ (1 mg/mL) – Sigma (Aldrich, USA)

2.2.1. Preparo

Pese 0,1 g de Vitamina K₁ e adicione a um tubo contendo 100 mL de etanol absoluto. Armazene o vidro em refrigerador, devidamente vedado e protegido da luz. Para usar como suplemento para o meio de cultura adicione 1 µL/mL.

2.3. Solução de Hemina (5 mg/mL) – Sigma (Aldrich, USA)

2.3.1. Preparo

Dissolva 0,5 g de Hemina em 10 mL de Hidróxido de sódio (1N). Complete com água destilada até atingir 100 mL. Autoclave a 121°C por 15 minutos. Para usar como suplemento para o meio de cultura adicione 1 µL/mL.

Este meio pode se tornar seletivo para várias espécies de anaeróbios através da adição do antibiótico apropriado:

2.4. FAA (*Fastidious Anaerobe Agar*) + NAL (ácido nalidíxico-X 091) – LAB-M (Bury, UK)

Meio seletivo para anaeróbios Gram-positivos não formadores de esporos.

2.4.1. Preparo

Para 500mL de água deionizada + FAA (g) + 5% de sangue desfibrinado de carneiro, utiliza-se um vidro de ácido nalidíxico (X091) (5 mg), previamente diluído em 5 mL de água destilada, adicionando-o assepticamente ao meio estéril e resfriado à 47°C.

Concentração final: Ácido nalidíxico=0,01mg/mL

2.5. FAA + NAL+ VAN (Vancomicina-X090)- LAB-M (Bury, UK)

Meio seletivo para anaeróbios Gram-negativos.

2.5.1. Preparo

Para 500mL de água deionizada + FAA (g) + 5% de sangue desfibrinado de carneiro, utiliza-se um vidro de ácido nalidíxico (X091) (5mg) e um vidro de vancomicina (X090) (1,25 mg), previamente diluídos em 5mL de água destilada, em seguida as misturas são adicionadas assepticamente ao meio estéril e resfriado à 47°C.

Concentração final:

Ácido nalidixico=0,01mg/mL

Vancomicina=0,0025mg/mL

2.6. FAA + NEO (neomicina-X015)- LAB-M (Bury, UK)

Meio seletivo para clostrídios e outros anaeróbios, como *Bacteroides fragilis* e alguns cocos anaeróbios.

2.6.1. Preparo

Para 500mL de água deionizada + FAA (g) + 5% de sangue de carneiro, utiliza-se um vidro de neomicina (37,5 mg) que é previamente diluído em 5mL de água destilada. Em seguida a mistura é adicionada assepticamente ao meio estéril e resfriado a 47°C.

Concentração final: neomicina=0,075mg/mL

2.7. FAA + VAN(X090) + KAN (Kanamicina-X018) – LAB-M (Bury, UK)

Meio seletivo para anaeróbios Gram-negativos, particularmente bactérias produtoras de pigmento negro.

2.7.1. Preparo

Para 500mL de água deionizado + FAA (g) + 5% de sangue de desfibrinado de carneiro, um vidro de vancomicina (X090) (1,25 mg) e um vidro de Kanamicina (X018) (37,5 mg) que são previamente diluídos em 5mL de água destilada. Em seguida as misturas são adicionadas assepticamente ao meio estéril e resfriado à 47°C.

Concentração final: Vancomicina =0,0025mg/mL; Kanamicina=0,075mg/mL

2.8. FAA + SUPLEMENTO ANAERÓBICO G-N

Anaerobe Selective Supplement G-N (OXOID, Hamshire, UK)

Suplemento seletivo para anaeróbios Gram-negativos.

Cada vidro é suficiente para suplementar 500mL de meio.

2.8.1. Composição

Hemina	2,50mg
Menadiona	0,25mg
Succinato sódico	1,23mg
Ácido nalidíxico	5,0mg
Vancomicina	1,25mg

2.8.2. Preparo

Agregar ao vidro 10mL de água destilada e misturar suavemente até dissolver completamente. Agregar o conteúdo do vidro a 500mL de meio de cultura + 5% de

sangue desfibrinado de carneiro que deve estar a 47°C. Misturar bem e distribuir em placas de petri estéreis.

2.9. *Fastidious Anaerobe Broth* (FAB) - LAB M (Bury, UK)

2.9.1. Descrição

Meio de cultura líquido capaz de favorecer o crescimento de bactérias anaeróbias e facultativas. As peptonas são incorporadas para a máxima estimulação de crescimento. Vitamina K, hemina e L-cisteína são também fatores de crescimento para alguns anaeróbios. L-cisteína e tioglicolato de sódio reduzem o Eh (redox) do meio e o ágar inibe a absorção do oxigênio.

2.9.2. Preparo

Dispensar 14,85g do pó em 500 mL de água deionizada. A mistura é dispensada em tubos que são deixados semiabertos durante a esterilização, que é feita por autoclavagem a 121°C por 15 min. Os tubos são fechados o mais rápido possível após a autoclavagem.

2.9.3. Aparência

Amarelo claro.

2.9.4. Armazenagem

Em tubos com tampas, até 3 meses a 15-20 °C fora do alcance da luz.

2.9.5. Inoculação

Se usado como meio de cultura com sangue, uma diluição mínima de 1:10 deve ser usada.

2.9.6. Incubação

37 °C por 24-72 horas. Tubos bem fechados.

2.9.7. Fórmula

	g/L
Mistura de peptonas	15,0
Cloreto de sódio	2,5
Extrato de levedura	1,0
Ágar nº 1	0,75
L-cisteína	0,5
Hemina	0,005
Vitamina K	0,005
Resazurina	0,001
Bicarbonato de sódio	0,4
pH: 7,4 ± 0,2	

2.10. *Brain Heart Infusion Agar* (BHI) – LAB M (Bury, UK)

2.10.1. Descrição

Este meio foi desenvolvido inicialmente para o isolamento de patógenos orais. Com a adição de 5% de sangue desfibrinado, este meio permite o crescimento da maioria dos microrganismos fastidiosos. O fosfato tamponado ajuda neutralizar os ácidos produzidos pela utilização da glicose, mantendo a viabilidade dos microrganismos. Este meio não é recomendado para a determinação das reações hemolíticas porque contém glicose em sua composição.

2.10.2. Preparo

Adicionar 24.5 g do pó em 500 ml de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min. e depois agitada. É esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 min. e resfriada a 47 °C antes de distribuir sobre as placas. Caso deseje adicionar assepticamente 5% de sangue desfibrinado de carneiro, misturar bem e distribuir nas placas de petri.

2.10.3. Aparência

Amarelo claro (sem a adição de sangue) ou vermelho devido à adição de sangue.

2.10.4. Armazenagem

Placas: até 7 dias a 4 °C no escuro.

2.10.5. Inoculação

Em superfície.

1.10.6 Incubação

Tempo e temperatura para cada microrganismo.

1.10.7. Fórmula

	g/L
Infusão de sólidos de cérebro e coração	17,5
Proteose petona	10,0
Glicose	2,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato di-sódico	2,5
Ágar nº 2	12,0
pH: 7,4 ± 0,2	

1.11. *Brain Heart Infusion Broth (BHI)* – LAB M (Bury, UK)

1.11.1. Descrição

Meio de infusão isotônico rico em triptose (uma mistura de carne e petonas do leite) promovendo uma ampla gama de substratos. Uma concentração baixa de glicose é utilizada para estimular o crescimento precoce. É ligeiramente tamponado para impedir a morte rápida de algumas espécies devido à produção de ácido.

1.11.2. Preparo

Dispensar 18,5 g do pó em 500 mL de água deionizada. A suspensão deve ficar em repouso por 10 minutos, sendo a seguir dissolvida sob aquecimento brando, antes de ser dispensada em tubos que são deixados semiabertos durante a esterilização. A esterilização é feita por autoclavagem a 121°C por 15 min. Os tubos são fechados o mais rápido possível após a autoclavagem.

1.11.3. Aparência

Amarelo claro.

1.11.4. Armazenagem

Em tubos com tampas, até 3 meses a 15-20 °C no escuro.

1.11.5. Inoculação (como meio de cultura para sangue)

Usar um volume mínimo de 50 mL de meio e adicionar sangue numa diluição de 1:10 a 1:20. Usar em conjunto com um meio de cultura anaeróbico.

1.11.6. Incubação

37 °C aerobicamente até 15 dias.

1.11.7. Fórmula

	g/L
Infusão de sólidos de cérebro de boi	12,5
Infusão de sólidos de coração	5,0
Proteose peptona	10,0
Glicose	2,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato di-sódico	2,5
pH: 7,4 ± 0,2	

1.12. *Brucella Medium Base* (OXOID – Hampshire, UK)

1.12.1. Descrição

As peptonas são incorporadas para máxima estimulação do crescimento microbiano. A glicose fornece fatores essenciais de crescimento para alguns anaeróbios. O nível baixo de glicose impede a produção de níveis elevados de ácidos e

de álcoois que poderiam inibir o crescimento microbiano. O ágar inibe a absorção do oxigênio e corrente de propagação.

1.12.2. Preparo

Misturar 22,5g do pó a 500mL de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 minutos e depois agitada. Autoclavagem a 121°C por 15 minutos e resfriada a 47°C. Adicionar assepticamente 5% de sangue desfibrinado de carneiro, 500µL de hemina e menadiona preparados previamente. Misturar bem e distribuir em placas de petri estéreis.

1.12.3. Aparência

Vermelho devido à adição de sangue. O meio fica escurecido após acrescentar a hemina.

1.12.4. Armazenagem

Placas: até 7 dias a 4°C fora do alcance da luz.

1.12.5. Inoculação

Plaqueamento na superfície da placa.

1.12.6. Incubação

A 37°C anaerobicamente em atmosfera de 80% H₂, 10% N₂, 10% CO₂, por períodos entre 48 horas e 7 dias.

1.12.7. Fórmula

	g/L
Peptona	10,0
Extrato de carne	5,0
Glicose	10,0
Cloreto de sódio	5,0
Agar	15,0
pH: 7,5 ± 0,2	

APÊNDICE 3 – Kits de Identificação Microbiana.

3.1. API 20 Strep - BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France.

3.1.1. Descrição

Api 20 Strep é um método padronizado que combina 20 testes bioquímicos que permitem a identificação, em grupos ou espécies, da maioria dos *Streptococcus* encontrados na microbiologia médica.

A fita do Api 20 Strep consiste em 20 microtubos contendo substratos desidratados para demonstração da atividade enzimática ou fermentação de açúcares.

Os testes enzimáticos são inoculados com uma suspensão densa de microrganismos, feita de uma cultura pura, que é utilizada para reidratar os substratos enzimáticos. Os produtos metabólicos finais produzidos durante o período de incubação são revelados através de reações caracterizadas por alterações cromáticas que ocorrem espontaneamente ou por adição de reagentes.

Os testes de fermentação são inoculados com um meio enriquecido (API GP Medium) que reconstituem os substratos de açúcares. A fermentação de carboidratos é detectada por uma mudança no indicador de pH.

As reações são lidas de acordo com o quadro de leitura do manual do fabricante, e a identificação obtida no catálogo “Api 20 Strep Analytical Profile Index”.

3.1.2. Materiais

Cada Kit contém:

- 25 fitas API 20 STREP
- 25 caixas para incubação
- 25 ampolas de API GP Medium
- 25 folhas de resposta
- 25 swabs

Produtos adicionais que não estão incluídos no Kit:

- Meio para suspensão: *Suspension Medium*, 2 ml
- Reagentes: NIN, VP 1, VP 2, ZYM A, ZYM B
- Padrão de McFarland
- Pipetas plásticas
- Óleo mineral
- Catálogo: *Api Staph Analytical Profile Index*
- Rack para ampolas
- Placas de ágar-sangue

Equipamentos laboratoriais requeridos:

- Estufa de incubação a 37 °C
- Refrigerador
- Bico de Bulsen
- Cabine ou jarra de anaerobiose

3.1.3. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas de ágar-sangue por 18-24 horas a 37°C, em condições aeróbicas ou anaeróbicas, de acordo com as melhores condições de crescimento das amostras. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração do Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. Esses procedimentos permitem a identificação primária das amostras como cocos Gram-positivos, catalase negativos e anaeróbios facultativos.

Um *swab* estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria no meio para suspensão (*Suspension Medium*) ou em água destilada estéril, para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 4.

Cinco mL de água são colocados no recipiente de incubação para manter a umidade da atmosfera e a tira do *Api Staph* é colocada dentro da caixa.

Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher os microtubos da tira do Api Strep com o inóculo bacteriano preparado até a metade da fita (até o teste da arginina-ADH). A seguir, abre uma ampola de “API GP Medium” e transfere o resto da suspensão para dentro dela, mistura bem, e preenche a segunda metade da fita (testes de ribose-RIB até glicogênio-GLYG). O recipiente para incubação é tampado, e incubado a 37 °C por 4 horas.

Após o período de incubação, são adicionados os reagentes VP 1 e VP 2 no teste do piruvato de sódio (VP); ZYM A e ZYM B no teste de PYRA até LAP, e NIN no teste HIP. Todas as reações são lidas baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas de acordo com o quadro do item.

Os resultados são colocados em uma folha de resposta, os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo “Api Strep Analytical Profile Index”.

3.2. Rapid ID 32 Strep - BioMérieux SA, Marcy-l’Etoile, France.

3.2.1. Descrição

Rapid ID 32 A é um sistema de identificação para streptococos e microrganismos relacionados utilizando testes enzimáticos standardizados e miniaturizados. Cada Kit contém 25 fitas, recipientes para incubação, folhas de resultados e um manual do Kit. Cada fita consiste de 32 cúpulas que são utilizadas para testes e contêm substratos desidratados. Após o período de incubação de 4 horas, as reações podem ser lidas visualmente, e a identificação obtida usando o catálogo “Rapid ID 32 A Analytical Profile Index.” ou o **mini API**.

3.2.2. Materiais

Produtos adicionais que não estão incluídos no Kit:

Meio para suspensão: *Suspension Medium*, 2 ml

- Reagentes: FB, NIN, VP A, VP B
- Padrão de McFarland
- Pipetas
- Swabs estéreis
- Catálogo: Rapid ID 32 Strep Analytical Profile Index

Equipamentos laboratoriais requeridos:

- Estufa de incubação a 37 °C
- Refrigerador
- Bico de Busen

3.2.3. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas Ágar sangue. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso.

Um *swab* estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria no meio líquido *Suspension Medium* ou em água destilada estéril para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 4.

Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher as cúpulas com o inóculo bacteriano preparado no *Suspension Medium*. Duas gotas de óleo mineral são adicionadas a cúpula URE (1.0). O recipiente para incubação é tampado, e incubado a 37°C anaerobicamente por 4 horas.

Após o período de incubação, são adicionados os reagentes VP A e VP B no teste do VP (cúpula 0.0); FB nos testes APPA e GTA (cúpulas 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 e 0.5); e NIN no teste de HIP (cúpula 0.6). Todas as reações são lidas após 5 minutos baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas.

Os resultados são colocados em uma folha de resposta, os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo “Rapid ID 32 Strep Analytical Profile Index” ou a leitura é feita no aparelho **mini API**.

3.3. API Staph - BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France

3.3.1. Descrição

Api Staph (# 20 500) é um sistema de identificação dos gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus* utilizando testes bioquímicos padronizados. O sistema consiste de uma tira contendo substratos desidratados em microtubos individuais. Os testes são realizados adicionando a cada tubo uma alíquota do meio *Api Staph Medium* que foi inoculado com a amostra bacteriana a ser estudada. Cada Kit contém 25 tiras, recipientes para incubação, ampolas de *Api Staph Medium*, folhas de resultados e um manual do Kit. A identificação das amostras pode ser interpretada no catálogo “Api Staph Analytical Profile Index” (bioMérieux, ref. 20 590).

3.3.2. Materiais

Produtos adicionais que não estão incluídos no Kit:

- Reagentes: VP 1, VP 2, NIT 1, NIT 2, ZYM A, ZYM B
- Padrão de McFarland
- Pipetas plásticas
- Swabs estéreis
- Óleo mineral
- Catálogo: Api Staph Analytical Profile Index

3.3.3. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas de ágar-sangue por 18-24 horas a 37 °C. a cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração do Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. Esses procedimentos permitem a identificação primária das amostras como cocos Gram-positivos, catalase positiva e aeróbios ou anaeróbios facultativos.

Um *swab* estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria no meio líquido “Api Staph Medium” para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 0,5.

Cinco mL de água são colocados no recipiente de incubação para manter a umidade da atmosfera e a tira do Api Staph é colocada dentro da caixa.

Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher os microtubos da tira do Api Staph com o inóculo bacteriano preparado no *Api Staph Medium*, evitando a formação de bolhas. Após preencher toda a tira, os tubos contendo os testes da arginina (ADH) e uréia (URE) são preenchidos com óleo mineral para promover anaerobiose. O recipiente para incubação é tampado, e incubado a 37 °C por 18-24 horas.

Após o período de incubação, são adicionados os reagentes VP 1 e VP 2 no teste do piruvato de sódio (VP); NIT 1 e NIT 2 no teste do nitrato de potássio (NIT); e ZYM A e ZYM B no teste do ácido β -naftil fosfato (PAL). Todas as reações são lidas baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas de acordo com o quadro do item 2.4. Os resultados são colocados em uma folha de resposta, os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo “Api Staph Analytical Profile Index”.

3.4. Rapid ID 32 A - BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France

3.4.1. Descrição

Rapid ID 32 A é um sistema de identificação para anaeróbios utilizando testes enzimáticos standardizados e miniaturizados. Cada Kit contém 25 fitas, recipientes para incubação, folhas de resultados e um manual do Kit. Cada fita consiste de 32 cúpulas, 29 das quais são utilizadas para testes e contêm substratos desidratados. Após o período de incubação de 4 horas, as reações podem ser lidas visualmente, e a identificação obtida usando o catálogo “Rapid ID 32 A Analytical Profile Index.”

3.4.2. Materiais

Produtos adicionais que não estão incluídos no Kit:

- Meio para suspensão: Suspension Medium, 2 ml
- Reagentes: JAMES, NIT 1, NIT 2, FB
- Padrão de McFarland
- Pipetas
- Swabs estéreis
- Óleo mineral
- Catálogo: Rapid ID 32 A Analytical Profile Index
- Placas de ágar-sangue com suplementos para o crescimento de bactérias anaeróbias.

Equipamentos laboratoriais requeridos:

- Estufa de incubação a 37 °C
- Refrigerador
- Bico de Busen
- Cabine ou jarra de anaerobiose

3.4.3. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas contendo *Fastidious Anaerobe Agar* mais sangue de carneiro desfibrinado por 24-48 horas a 37 °C anaerobicamente. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso.

Um *swab* estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria no meio líquido *Suspension Medium* ou em água destilada estéril para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 4.

Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher as cúpulas com o inóculo bacteriano preparado no *Suspension Medium*. Duas gotas de óleo mineral são

adicionadas a cúpula URE (1.0). O recipiente para incubação é tampado, e incubado a 37°C anaerobicamente por 4 horas.

Após o período de incubação, são adicionados os reagentes NIT 1 e NIT 2 no teste do NIT (cúpula 0.0) para verificar a redução de nitratos; JAMES no teste IND (cúpula 0.1) para verificar a produção de indol; e FB nos testes de PAL a SerA (cúpula 0.2 a 0.E). Todas as reações são lidas baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas.

Os resultados são colocados em uma folha de resposta, os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo "Rapid ID 32 A Analytical Profile Index".

3.5. Api 20 C AUX

3.5.1. Descrição

Api 20 C AUX é um sistema de identificação preciso para a maioria dos fungos encontrados na clínica microbiológica.

O API 20 C AUX consiste em 20 microtubos contendo substratos desidratados para demonstração da atividade enzimática ou fermentação de açúcares. Os microtubos são inoculados com um meio semi-sólido e os fungos crescerão apenas se forem capazes de utilizar cada substrato. As reações são lidas em comparação com o crescimento controle e identificação é obtida pelo catálogo *Analytical Profile Index* ou usando um programa computadorizado de identificação.

3.5.2. Materiais

Um Kit contém:

- 25 fitas API 20 C AUX
- 25 caixas para incubação
- 25 ampolas de C Medium

- 25 folhas de resposta

Produtos adicionais que não estão incluídos no Kit:

- Meio para suspensão: *Suspension Medium* (2 mL) ou NaCl 0,85% (2 mL)
- Ágar Sabouraud
- Padrão de McFarland #2
- Pipetas plásticas
- Óleo mineral
- Catálogo: API 20 C AUX Analytical Profile Index ou programa computadorizado de identificação
- Rack para ampolas

Equipamentos laboratoriais requeridos:

- Estufa de incubação a 30 °C
- Refrigerador
- Bico de Busen
- Caneta para vidro

3.5.3. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas de ágar-sabouraud 18-24 horas a 37°C, em condições aeróbicas ou anaeróbicas, de acordo com as melhores condições de crescimento das amostras. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração do Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. Esses procedimentos permitem a identificação primária das amostras como cocos Gram-positivos, catalase negativos e anaeróbios facultativos.

Um *swab* estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria em 2 mL meio para suspensão *Suspension Medium* ou em água destilada estéril, para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 2. São colocados 100 µL no tubo “C Medium”.

Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher os microtubos da tira do API C AUX com o inóculo bacteriano preparado C Medium. Evite a formação de bolhas. Incubar a 30°C por 48-72 horas.

Após o período de incubação checar o crescimento, após 48 h o GLU deve estar mais turvo que o controle (cúpula “0” da galeria) para ser interpretada a leitura de toda a galeria. Através do catálogo “Analytical Profile Index” os resultados numéricos obtidos pelas reações podem ser identificados.

3.6. RapID ANA II - Innovative Diagnostic Systems Inc., Atlanta, GA., USA.

3.6.1. Descrição

O sistema RapID ANA II é um método miniaturizado empregado para identificação bioquímica de substratos cromogênicos e convencionais, neste caso, de bactérias anaeróbias clinicamente significantes.

Cada *kit* consiste de 20 recipientes para testes de RapID ANA II, bloco de anotações para os resultados, manual de instruções, manual de dados (RapID ANA II System Code Compendium) e 1 frasco de reagente RapID ANA II.

Cada recipiente de RapID ANA II contém 10 cavidades com reações (reações desidratadas) e proporciona 18 scores de teste. As cavidades de 3 a 10 são bifuncionais, contendo 2 testes diferentes na mesma cavidade. Teste bifuncional significa que o primeiro score é obtido sem adição do reagente, mostrando o primeiro resultado do teste. Na mesma cavidade é observado outro score com a adição do reagente fornecendo o resultado do segundo teste. A identificação é obtida após 4 horas de incubação.

O recipiente de teste RapID ANA II e reagentes devem ser estocados a 2-10°C. O fluido para inoculação RapID (RapID Inoculation Fluid), deve ser estocado a 15-30°C, na embalagem original.

3.6.2. Materiais

- 25 tubos fechados contendo em cada 1 mL de fluido de inoculação RapID (#25-102)

KCl.....7,5

CaCl₂.....0,5g

Água deionizada.....1000 mL

Ph: 7,5-9,5.

- 1 frasco contendo 15 mL de reagente Innova Spot Indole (#30-9002)
- 1 frasco contendo reagente suficiente para 20 recipientes de RapID ANA II Reagent
- Ingredientes reativos
 - 3-fenil 4 metilaninoacrolein.....0,01 %
 - Ácido hidrocloreídrico.....0,1 %
 - Ácido acético.....1 %
 - Detergente.....0,1 %
- Swabs estéreis
- Pipetas estéreis
- Padrão McFarland: 3
- Placas contendo FAA + 5% de sangue de carneiro desfibrinado
- Jarras para anaerobiose + gerador de anaerobiose (Anaerogen-OXOID, Hampshire-Inglterra) + indicadores de anaerobiose (OXOID, Hampshire-Inglterra) ou Câmara de anaerobiose

3.6.3. Procedimentos para identificação

Os microrganismos são subcultivados em placas contendo FAA + 5% de sangue de carneiro por 18 a 24 horas a 37° C. As culturas puras são primariamente checadas pela morfologia da colônia, coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso.

Um *swab* estéril é usado para inoculação das colônias bacterianas no fluido de inoculação RapID. A suspensão do microrganismo que será testado deve atingir no mínimo o equivalente ao padrão MacFarland 3 (uma suspensão com turbidez menor que o padrão MacFarland 3 pode comprometer o desenvolvimento do teste). As suspensões são agitadas (se necessário) e usadas até 15 minutos do preparo. A película de proteção do recipiente é devidamente deslocada para a inoculação bacteriana.

Uma pipeta estéril é introduzida na suspensão bacteriana e todo o conteúdo é transferido para o recipiente de teste, na cúpula do canto direito superior. O recipiente para teste é então selado novamente pela película de proteção, mantendo-o em posição horizontal em superfície plana. Este é gentilmente inclinado, de forma que a suspensão seja distribuída uniformemente nas cúpulas superiores. Em seguida o recipiente é inclinado aproximadamente 45° C durante 4 horas.

Após a incubação do recipiente, cada cavidade é examinada quanto à reação enzimática, observando presença ou ausência de coloração, sendo este o primeiro resultado.

Ao adicionarmos os reagentes nas cavidades de teste específicas, obtém-se o segundo resultado, através da reação do reagente e observando-se a alteração de cor.

O resultado obtido é comparado com o padrão, que é encontrado no manual de dados.

3.7. RapID NH system - Innovative Diagnostic Systems Inc., Atlanta, GA., USA.

3.7.1. Descrição

O sistema RapID NH é um método miniaturizado qualitativo empregado para identificação de espécies clinicamente significantes de *Neisseria* e *Haemophilus*, e também *Eikenella* e *Actinobacillus*, através de substratos convencionais e cromogênico.

Cada *Kit* consiste de 20 recipientes para testes de RapID NH, blocos de anotações para resultados e um manual de instruções.

Após 4 horas de incubação as reações são obtidas através da leitura visual. Identificações são realizadas usando cada *score* de teste individual, em conjunto com as informações obtidas através da morfologia colonial, coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. O resultado padrão do *score* positivo e negativo é usado como base para identificação do teste isolado pela comparação dos resultados obtidos com resultado padrão que é encontrado no manual de dados (*RapID NH System Code Compendium*).

O recipiente de teste RapID NH e reagentes devem ser estocados a 2-10°C. O fluido para inoculação RapID (RapID Inoculation Fluid), deve ser estocado a 15-30°C, na embalagem original.

3.7.2. Materiais

- 25 tubos fechados contendo em cada 1 mL de fluido de inoculação RapID (#25-102)
- KCl.....7,5g
- CaCl₂.....0,5g
- Água deionizada.....1000mL

Ph: 7,5-9,5.

- 1 frasco contendo 15 mL de reagente Innova Spot Indole (#30-9002)
- 1 frasco contendo 15 mL de reagente Innova Nitrate Reagent A (#30-9003)
- 1 frasco contendo 15 mL de reagente Innova Nitrate Reagent A (#30-9004)
- Swabs estéreis
- Padrão MacFarland: 3
- Placas contendo FAA + 5% de sangue desfibrinado de carneiro
- Jarras para anaerobiose + gerador de anaerobiose (Anaerogen-OXOID, Hampshire-Inglaterra) + indicadores de anaerobiose (OXOID, Hampshire-Inglaterra) ou Câmara de anaerobiose.

3.7.3. Procedimentos para identificação

Os microrganismos são subcultivados em placas contendo FAA + 5% de sangue de carneiro por 18 a 24 horas a 37° C. As culturas puras são primariamente checadas pela morfologia da colônia, coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso.

Um *swab* estéril é usado para inoculação das colônias bacterianas no fluido de inoculação RapID. A suspensão do microrganismo que será testado deve atingir no mínimo o equivalente ao padrão MacFarland 3 (uma suspensão com turbidez menor que o padrão MacFarland 3 pode comprometer o desenvolvimento do teste). As suspensões são agitadas (se necessário) e usadas até 15 minutos do preparo. A película de proteção do recipiente é devidamente deslocada para a inoculação bacteriana.

Uma pipeta estéril é introduzida na suspensão bacteriana e todo o conteúdo é transferido para o recipiente de teste, na cúpula do canto direito superior. O recipiente para teste é então selado novamente pela película de proteção, mantendo-o em posição horizontal em superfície plana. Este é gentilmente inclinado, de forma que a suspensão seja distribuída uniformemente nas cúpulas superiores. Em seguida o recipiente é inclinado aproximadamente 45° C durante 4 horas.

Após a incubação do recipiente, cada cavidade é examinada quanto à reação enzimática, observando presença ou ausência de coloração, sendo este o primeiro resultado.

Ao adicionarmos os reagentes nas cavidades de teste específicas, obtém-se o segundo resultado, através da reação do reagente e observando-se a alteração de cor.

O resultado obtido é comparado com o padrão, que é encontrado no manual de dados.

APÊNDICE 4. Aspectos microbiológicos (identificação por Cultura) e radiográficos de 21 dentes investigados.

AMOSTRA	DENTE	CRT (mm)	ÁREA (mm ²)	PERÍMETRO	FORMA	GRAM	H ₂ /O ₂	GÊNERO	ESPÉCIE
C1.1	P2 D	9,75	0,06	1,44	coco	+	ANF	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>
C1.3	P3 D	10,5	0,13	1,9	coco/bacilo	-	ANE	<i>Prevotella</i>	<i>oralis</i>
C2.1	P2 D	10	0,06	1,79	coco/bacilo	-	ANE	<i>Porphyromonas</i>	<i>gingivalis</i>
					bacilo	-	ANE	<i>Clostridium</i>	<i>tyrobutyricum</i>
					coco	+	ANE	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>anaerobius</i>
					coco/bacilo	-	ANE	<i>Prevotella</i>	<i>oralis</i>
C2.3	P3 D	11	0,11	2,04	-----	-----	---	-----	-----
C2.5	P4 D	14	0,18	2,94	bacilo	-	ANF	-----	-----
					coco	+	ANF	<i>Staphylococcus</i>	<i>intermedius</i>
C2.7	P2 E	10	0,16	2,23	coco	-	ANF	<i>Neisseria</i>	<i>sicca/subflava</i>
C2.9	P3 E	11	0,16	2,41	bacilo	+	ANE	<i>Propionibacterium</i>	<i>acnes</i>
					coco	+	ANF	<i>Staphylococcus</i>	<i>intermedius</i>
					bacilo	-	ANF	-----	-----
					coco	-	ANF	<i>Neisseria</i>	<i>sicca/subflava</i>
					coco	+	ANF	<i>Streptococcus</i>	<i>bovis I</i>
C2.11	P4 E	14	0,15	2,38	coco	-	ANF	<i>Neisseria</i>	<i>sicca/subflava</i>
					bacilo	+	ANF	<i>Propionibacterium</i>	<i>propionicum</i>

P2 D= segundo pré-molar direito; **P2 E**= segundo pré-molar esquerdo; **P3 D**= terceiro pré-molar direito; **P3 E**= terceiro pré-molar esquerdo; **P4 D**= quarto pré-molar direito; **P4 E**= quarto pré-molar esquerdo; **ANE**= anaeróbio estrito; **ANF**= anaeróbio facultativo.

APÊNDICE 4. Aspectos microbiológicos (identificação por Cultura) e radiográficos de 21 dentes investigados (continuação).

AMOSTRA	DENTE	CRT (mm)	ÁREA (mm ²)	PERÍMETRO	FORMA	GRAM	H ₂ /O ₂	GÊNERO	ESPÉCIE
C2.11	P4 E	14	0,15	2,38	coco	+	ANF	<i>Streptococcus</i>	<i>bovis I</i>
					coco	+	ANF	<i>Streptococcus</i>	<i>bovis II</i>
					bacilo	-	ANE	<i>Prevotella</i>	<i>oralis</i>
C3.1	P2 D	9,5	0,05	1,41	bacilo	+	ANE	<i>Propionibacterium</i>	<i>acnes</i>
					bacilo	+	ANF	<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>
C3.3	P3 D	11	0,12	2,21	coco	-	ANF	<i>Neisseria</i>	<i>sicca/subflava</i>
					bacilo	+	ANF	<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>
					bacilo	+	ANF	<i>Actinomyces</i>	<i>naeslundii</i>
					bacilo	+	ANF	<i>Bifidobacterium</i>	<i>ssp</i>
					bacilo	+	ANF	<i>Propionibacterium</i>	<i>acnes</i>
					coco	-	ANF	<i>Streptococcus</i>	<i>suis II</i>
					coco	-	ANE	-----	-----
					coco	+	ANE	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>ssp</i>
C3.5	P4 D	13	0,19	2,61	coco	+	ANF	<i>Staphylococcus</i>	<i>capitis</i>
					coco	+	ANF	<i>Streptococcus</i>	<i>bovis I</i>
					coco	+	ANF	<i>Streptococcus</i>	<i>bovis II</i>
					bacilo	-	ANE	<i>Prevotella</i>	<i>oralis</i>
					bacilo	+	ANF	<i>Bifidobacterium</i>	<i>ssp</i>
					bacilo	+	ANF	<i>Propionibacterium</i>	<i>propionicum</i>
					bacilo	+	ANF	<i>Propionibacterium</i>	<i>acnes</i>

P2 D= segundo pré-molar direito; **P2 E=** segundo pré-molar esquerdo; **P3 D=** terceiro pré-molar direito; **P3 E=** terceiro pré-molar esquerdo; **P4 D=** quarto pré-molar direito; **P4 E=** quarto pré-molar esquerdo; **ANE=** anaeróbio estrito; **ANF=** anaeróbio facultativo.

APÊNDICE 4. Aspectos microbiológicos (identificação por Cultura) e radiográficos de 21 dentes investigados (continuação).

AMOSTRA	DENTE	CRT (mm)	ÁREA (mm ²)	PERÍMETRO	FORMA	GRAM	H ₂ /O ₂	GÊNERO	ESPÉCIE
C3.7	P2 E	9,5	0,07	1,79	-----	-----	-----	-----	-----
C3.9	P3 E	10,5	0,13	2,09	bacilo	+	ANF	<i>Propionibacterium</i>	<i>propionicum</i>
					coco	+	ANF	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>
					coco	+	ANF	<i>Aerococcus</i>	<i>viridans</i>
C3.11	P4 E	13	0,13	12,31	coco	+	ANF	<i>Enterococcus</i>	<i>avium</i>
					coco	+	ANF	<i>Aerococcus</i>	<i>airidans 3</i>
					coco	-	ANF	<i>Neisseria</i>	<i>sicca/subflava</i>
					coco	+	ANF	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>
					bacilo	+	ANF	-----	-----
C4.1	P2 D	10,5	0,05	1,28	coco	+	ANF	<i>Staphylococcus</i>	<i>intermedius</i>
C4.3	P3 D	11	0,12	1,79	-----	-----	-----	-----	-----
C4.5	P4 D	13	0,21	2,43	bacilo	+	ANF	<i>Bifidobacterium</i>	<i>ssp</i>
					coco	+	ANF	<i>Staphylococcus</i>	<i>xylosus</i>
					coco	+	ANF	<i>Streptococcus</i>	<i>bovis I</i>
C4.5	P4 D	13	0,21	2,43	coco	+	ANF	<i>Abiotrophia</i>	<i>adiacens</i>
C4.7	P2 E	9,5	0,04	1,11	coco	+	ANF	<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>
					coco	+	ANF	<i>Streptococcus</i>	<i>ssp</i>
					coco	+	ANF	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>

P2 D= segundo prémolar direito; **P2 E=** segundo prémolar esquerdo; **P3 D=** terceiro prémolar direito; **P3 E=** terceiro prémolar esquerdo; **P4 D=** quarto prémolar direito; **P4 E=** quarto prémolar esquerdo; **ANE=** anaeróbio estrito; **ANF=** anaeróbio facultativo.

APÊNDICE 4. Aspectos microbiológicos (identificação por Cultura) e radiográficos de 21 dentes investigados (continuação).

AMOSTRA	DENTE	CRT (mm)	ÁREA (mm ²)	PERÍMETRO	FORMA	GRAM	H ₂ /O ₂	GÊNERO	ESPÉCIE
C4.9	P3 E	11	0,07	1,63	coco	+	ANF	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis cremoris</i>
					coco	+	ANF	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>
					coco	-	ANF	<i>Neisseria</i>	<i>sicca/subflava</i>
					coco	+	ANF	<i>Staphylococcus</i>	<i>lentus</i>
					coco	+	ANF	<i>Streptococcus</i>	<i>suis</i>
C4.11	P4 E	13	0,15	2,21	coco	-	ANF	<i>Neisseria</i>	<i>sicca/subflava</i>
					coco	+	ANF	<i>Lactococcus</i>	<i>latis cremoris</i>
					coco	+	ANF	<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>
C5.1	P2 D	9,75	0,04	1,44	-----	-----	-----	-----	-----
C5.3	P3 D	10,5	0,17	2,57	-----	-----	-----	-----	-----
C5.5	P4 D	13,5	0,23	2,95	bacilo	+	ANF	<i>Actinomyces</i>	<i>israeli</i>
C5.7	P2 E	10	0,02	1,03	bacilo	+	ANE	<i>Clostridium</i>	<i>clostridiforme</i>
					bacilo	-	ANE	<i>Prevotella</i>	<i>oralis</i>
C5.7	P2 E	10	0,02	1,03	bacilo	+	ANF	<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>
C5.9	P3 E	11	0,08	1,82	bacilo	+	ANE	-----	-----
C5.11	P4 E	13,5	0,12	2,49	bacilo	-	ANE	<i>Bacteroides</i>	<i>uniformis</i>
					bacilo	+	ANF	<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>
					bacilo	+	ANF	<i>Propionibacterium</i>	<i>propionicum</i>
					bacilo	-	ANE	<i>Bacteroides</i>	<i>capillosus</i>

P2 D= segundo prémolar direito; **P2 E=** segundo prémolar esquerdo; **P3 D=** terceiro prémolar direito; **P3 E=** terceiro prémolar esquerdo; **P4 D=** quarto prémolar direito; **P4 E=** quarto prémolar esquerdo; **ANE=** anaeróbio estrito; **ANF=** anaeróbio facultativo.

APÊNDICE 5. Aspectos microbiológicos (identificação por *checkerboard*) e radiográficos de 21 dentes investigados.

Nº	AMOSTRA	DENTE	MÉDIA DO COMPRIMENTO (mm)	ÁREA (mm ²)	PERÍMETRO	H ₂ /O ₂	FORMA	GRAM	GÊNERO	ESPÉCIE
3	C2.1	P2 D	10*	0,06	1,79				<i>Streptococcus</i>	<i>gordonii</i>
									<i>Campylobacter</i>	<i>gracilis</i>
4	C2.3	P3 D	11	0,11	2,04				-----	-----
5	C2.5	P4 D	14	0,18	2,94				<i>Streptococcus</i>	<i>intermedius</i>
									<i>Treponema</i>	<i>denticola</i>
									<i>Prevotella</i>	<i>nigrescens</i>
									<i>Streptococcus</i>	<i>gordonii</i>
									<i>Bacteroides</i>	<i>forsythus</i>
									<i>Prevotella</i>	<i>melaninogenica</i>
									<i>Streptococcus</i>	<i>mitis</i>
									<i>Eikenella</i>	<i>corrodens</i>
									<i>Gemella</i>	<i>morbilorum</i>
									<i>Capnocytophaga</i>	<i>sputigena</i>
									<i>Leptotrichia</i>	<i>buccalis</i>
									<i>Campylobacter</i>	<i>gracilis</i>
									<i>Prevotella</i>	<i>intermedia</i>

P2 D= segundo pré-molar direito; **P2 E=** segundo pré-molar esquerdo; **P3 D=** terceiro pré-molar direito; **P3 E=** terceiro pré-molar esquerdo; **P4 D=** quarto pré-molar direito; **P4 E=** quarto pré-molar esquerdo.

APÊNDICE 5. Aspectos microbiológicos (identificação por *checkerboard*) e radiográficos de 21 dentes investigados (continuação).

Nº	AMOSTRA	DENTE	MÉDIA DO COMPRIMENTO (mm)	ÁREA (mm ²)	PERÍMETRO	H2/O 2	FORMA	GRAM	GÊNERO	ESPÉCIE
6	C2.7	P2 E	10*	0,16	2,23				<i>Treponema</i>	<i>denticola</i>
									<i>Prevotella</i>	<i>nigrescens</i>
									<i>Prevotella</i>	<i>melaninogenica</i>
									<i>Streptococcus</i>	<i>mitis</i>
									<i>Gemella</i>	<i>morbilorum</i>
									<i>Capnocytophaga</i>	<i>sputigena</i>
									<i>Campylobacter</i>	<i>gracilis</i>
									<i>Prevotella</i>	<i>intermedia</i>
7	C2.9	P3 E	11	0,16	2,41				<i>Treponema</i>	<i>denticola</i>
									<i>Prevotella</i>	<i>nigrescens</i>
									<i>Capnocytophaga</i>	<i>sputigena</i>
									<i>Campylobacter</i>	<i>gracilis</i>
									<i>Prevotella</i>	<i>intermedia</i>
8	C2.11	P4 E	14	0,15	2,38				<i>Prevotella</i>	<i>nigrescens</i>
									<i>Capnocytophaga</i>	<i>sputigena</i>
									<i>Leptotrichia</i>	<i>buccalis</i>
									<i>Campylobacter</i>	<i>gracilis</i>
									<i>Prevotella</i>	<i>intermedia</i>

P2 D= segundo pré-molar direito; **P2 E=** segundo pré-molar esquerdo; **P3 D=** terceiro pré-molar direito; **P3 E=** terceiro pré-molar esquerdo; **P4 D=** quarto pré-molar direito; **P4 E=** quarto pré-molar esquerdo.

APÊNDICE 5. Aspectos microbiológicos (identificação por *checkerboard*) e radiográficos de 21 dentes investigados (continuação).

Nº	AMOSTRA	DENTE	MÉDIA DO COMPRIMENTO (mm)	ÁREA (mm ²)	PERÍMETRO	H ₂ /O ₂	FORMA	GRAM	GÊNERO	ESPÉCIE
9	C3.1	P2 D	9,5	0,05	1,41				<i>Gemella</i>	<i>morbilorum</i>
									<i>Capnocytophaga</i>	<i>sputigena</i>
									<i>Leptotrichia</i>	<i>buccalis</i>
									<i>Campylobacter</i>	<i>gracilis</i>
									<i>Prevotella</i>	<i>intermedia</i>
10	C3.3	P3 D	11	0,12	2,21				<i>Fusobacterium</i>	<i>periodonticum</i>
									<i>Neisseria</i>	<i>mucosa</i>
									<i>Streptococcus</i>	<i>gordonii</i>
									<i>Bacteroides</i>	<i>forsythus</i>
									<i>Prevotella</i>	<i>melaninogenica</i>
									<i>Streptococcus</i>	<i>mitis</i>
									<i>Gemella</i>	<i>morbilorum</i>
									<i>Capnocytophaga</i>	<i>sputigena</i>
									<i>Leptotrichia</i>	<i>buccalis</i>
									<i>Campylobacter</i>	<i>gracilis</i>

P2 D= segundo pré-molar direito; **P2 E=** segundo pré-molar esquerdo; **P3 D=** terceiro pré-molar direito; **P3 E=** terceiro pré-molar esquerdo; **P4 D=** quarto pré-molar direito; **P4 E=** quarto pré-molar esquerdo.

APÊNDICE 5. Aspectos microbiológicos (identificação por *checkerboard*) e radiográficos de 21 dentes investigados (continuação).

N°	AMOSTRA	DENTE	MÉDIA DO COMPRIMENTO (mm)	ÁREA (mm ²)	PERÍMETRO	H ₂ /O ₂	FORMA	GRAM	GÊNERO	ESPÉCIE
11	C3.5	P4 D	13	0,19	2,61				<i>Fusobacterium</i>	<i>periodonticum</i>
									<i>Neisseria</i>	<i>mucosa</i>
									<i>Streptococcus</i>	<i>gordonii</i>
									<i>Bacteroides</i>	<i>forsythus</i>
									<i>Selenomonas</i>	<i>noxia</i>
									<i>Gemella</i>	<i>morbilorum</i>
									<i>Capnocytophaga</i>	<i>sputigena</i>
									<i>Leptotrichia</i>	<i>buccalis</i>
14	C3.11	P4 E	13	0,13	12,31				<i>Streptococcus</i>	<i>constellatus</i>
									<i>Eubacterium</i>	<i>nodatum</i>
									<i>Porphyromonas</i>	<i>gingivalis</i>
									<i>Streptococcus</i>	<i>mitis</i>
									<i>Eikenella</i>	<i>corrodens</i>
									<i>Gemella</i>	<i>morbilorum</i>
									<i>Capnocytophaga</i>	<i>sputigena</i>
									<i>Leptotrichia</i>	<i>buccalis</i>
									<i>Campylobacter</i>	<i>gracilis</i>
									<i>Prevotella</i>	<i>intermedia</i>

P2 D= segundo pré-molar direito; **P2 E=** segundo pré-molar esquerdo; **P3 D=** terceiro pré-molar direito; **P3 E=** terceiro pré-molar esquerdo; **P4 D=** quarto pré-molar direito; **P4 E=** quarto pré-molar esquerdo.

APÊNDICE 5. Aspectos microbiológicos (identificação por *checkerboard*) e radiográficos de 21 dentes investigados (continuação).

Nº	AMOSTRA	DENTE	MÉDIA DO COMPRIMENTO (mm)	ÁREA (mm ²)	PERÍMETRO	H ₂ /O ₂	FORMA	GRAM	GÊNERO	ESPÉCIE
15	C4.1	P2 D	10,5	0,05	1,28				<i>Selenomonas</i>	<i>noxia</i>
									<i>Streptococcus</i>	<i>mitis</i>
									<i>Gemella</i>	<i>morbilorum</i>
									<i>Capnocytophaga</i>	<i>sputigena</i>
									<i>Leptotrichia</i>	<i>buccalis</i>
									<i>Campylobacter</i>	<i>gracilis</i>
									<i>Prevotella</i>	<i>intermedia</i>
16	C4.3	P3 D	11	0,12	1,79				-----	-----
17	C4.5	P4 D	13	0,21	2,43				<i>Campylobacter</i>	<i>gracilis</i>
18	C4.7	P2 E	9,5	0,04	1,11				<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>
									<i>Streptococcus</i>	<i>gordonii</i>
									<i>Campylobacter</i>	<i>gracilis</i>

P2 D= segundo pré-molar direito; **P2 E=** segundo pré-molar esquerdo; **P3 D=** terceiro pré-molar direito; **P3 E=** terceiro pré-molar esquerdo; **P4 D=** quarto pré-molar direito; **P4 E=** quarto pré-molar esquerdo.

APÊNDICE 5. Aspectos microbiológicos (identificação por *checkerboard*) e radiográficos de 21 dentes investigados (continuação).

Nº	AMOSTRA	DENTE	MÉDIA DO COMPRIMENTO (mm)	ÁREA (mm ²)	PERÍMETRO	H ₂ /O ₂	FORMA	GRAM	GÊNERO	ESPÉCIE
19	C4.9	P3 E	11	0,07	1,63				<i>Eubacterium</i>	<i>saburreum</i>
									<i>Peptostreptococcus</i>	<i>micros</i>
									<i>Veillonella</i>	<i>parvula</i>
									<i>Actinomyces</i>	<i>viscosus</i>
									<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>
									<i>Streptococcus</i>	<i>sanguis</i>
									<i>Capnocytophaga</i>	<i>ochracea</i>
									<i>Streptococcus</i>	<i>intermedius</i>
									<i>Prevotella</i>	<i>nigrescens</i>
									<i>Fusobacterium</i>	<i>periodonticum</i>
									<i>Neisseria</i>	<i>mucosa</i>
									<i>Streptococcus</i>	<i>gordonii</i>
									<i>Prevotella</i>	<i>melaninogenica</i>
									<i>Streptococcus</i>	<i>mitis</i>
									<i>Gemella</i>	<i>morbillosum</i>
									<i>Capnocytophaga</i>	<i>sputigena</i>
									<i>Leptotrichia</i>	<i>buccalis</i>
									<i>Campylobacter</i>	<i>gracilis</i>
									<i>Prevotella</i>	<i>intermedia</i>

P2 D= segundo pré-molar direito; **P2 E=** segundo pré-molar esquerdo; **P3 D=** terceiro pré-molar direito; **P3 E=** terceiro pré-molar esquerdo; **P4 D=** quarto pré-molar direito; **P4 E=** quarto pré-molar esquerdo.

APÊNDICE 5. Aspectos microbiológicos (identificação por *checkerboard*) e radiográficos de 21 dentes investigados (continuação).

Nº	AMOSTRA	DENTE	MÉDIA DO COMPRIMENTO (mm)	ÁREA (mm ²)	PERÍMETRO	H ₂ /O ₂	FORMA	GRAM	GÊNERO	ESPÉCIE
20	C4.11	P4 E	13	0,15	2,21				<i>Peptostreptococcus</i>	<i>micros</i>
									<i>Veillonella</i>	<i>parvula</i>
									<i>Actinomyces</i>	<i>viscosus</i>
									<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>
									<i>Streptococcus</i>	<i>sanguis</i>
									<i>Capnocytophaga</i>	<i>ochracea</i>
									<i>Streptococcus</i>	<i>intermedius</i>
									<i>Capnocytophaga</i>	<i>sputigena</i>
									<i>Leptotrichia</i>	<i>buccalis</i>
									<i>Campylobacter</i>	<i>gracilis</i>
									<i>Prevotella</i>	<i>intermedia</i>
21	C5.1	P2 D	9,75	0,04	1,44				<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>
									<i>Capnocytophaga</i>	<i>ochracea</i>
									<i>Streptococcus</i>	<i>intermedius</i>

P2 D= segundo pré-molar direito; **P2 E=** segundo pré-molar esquerdo; **P3 D=** terceiro pré-molar direito; **P3 E=** terceiro pré-molar esquerdo; **P4 D=** quarto pré-molar direito; **P4 E=** quarto pré-molar esquerdo.

APÊNDICE 5. Aspectos microbiológicos (identificação por *checkerboard*) e radiográficos de 21 dentes investigados (continuação).

Nº	AMOSTRA	DENTE	MÉDIA DO COMPRIMENTO (mm)	ÁREA (mm ²)	PERÍMETRO	H ₂ /O ₂	FORMA	GRAM	GÊNERO	ESPÉCIE
22	C5.3	P3 D	10	0,17	2,57				<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>
									<i>Streptococcus</i>	<i>sanguis</i>
									<i>Capnocytophaga</i>	<i>ochracea</i>
									<i>Streptococcus</i>	<i>intermedius</i>
									<i>Campylobacter</i>	<i>showae</i>
									<i>Fusobacterium</i>	<i>periodonticum</i>
									<i>Neisseria</i>	<i>mucosa</i>
									<i>Fusobacterium</i>	<i>nucleatum</i> sp. <i>nucleatum</i>
									<i>Capnocytophaga</i>	<i>gingivalis</i>
									<i>Streptococcus</i>	<i>gordonii</i>
									<i>Capnocytophaga</i>	<i>sputigena</i>
									<i>Leptotrichia</i>	<i>buccalis</i>
									<i>Campylobacter</i>	<i>gracilis</i>
									<i>Prevotella</i>	<i>intermedia</i>

P2 D= segundo pré-molar direito; **P2 E=** segundo pré-molar esquerdo; **P3 D=** terceiro pré-molar direito; **P3 E=** terceiro pré-molar esquerdo; **P4 D=** quarto pré-molar direito; **P4 E=** quarto pré-molar esquerdo.

APÊNDICE 5. Aspectos microbiológicos (identificação por *checkerboard*) e radiográficos de 21 dentes investigados (continuação).

Nº	AMOSTRA	DENTE	MÉDIA DO COMPRIMENTO (mm)	ÁREA (mm ²)	PERÍMETRO	H ₂ /O ₂	FORMA	GRAM	GÊNERO	ESPÉCIE
23	C5.5	P4 D	13,5	0,23	2,95				<i>Fusobacterium</i>	<i>periodonticum</i>
									<i>Neisseria</i>	<i>mucosa</i>
									<i>Fusobacterium</i>	<i>nucleatum</i> sp. <i>nucleatum</i>
									<i>Capnocytophaga</i>	<i>gingivalis</i>
									<i>Streptococcus</i>	<i>gordonii</i>
									<i>Leptotrichia</i>	<i>buccalis</i>
									<i>Campylobacter</i>	<i>gracilis</i>
									<i>Prevotella</i>	<i>intermedia</i>

P2 D= segundo pré-molar direito; **P2 E=** segundo pré-molar esquerdo; **P3 D=** terceiro pré-molar direito; **P3 E=** terceiro pré-molar esquerdo; **P4 D=** quarto pré-molar direito; **P4 E=** quarto pré-molar esquerdo.

APÊNDICE 5. Aspectos microbiológicos (identificação por *checkerboard*) e radiográficos de 21 dentes investigados (continuação).

N°	AMOSTRA	DENTE	MÉDIA DO COMPRIMENTO (mm)	ÁREA (mm ²)	PERÍMETRO	H2/O2	FORMA	GRAM	GÊNERO	ESPÉCIE
24	C5.7	P2 E	10	0,02	1,03				<i>Streptococcus</i>	<i>constellatus</i>
									<i>Eubacterium</i>	<i>saburreum</i>
									<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>
									<i>Streptococcus</i>	<i>sanguis</i>
									<i>Capnocytophaga</i>	<i>ochracea</i>
									<i>Streptococcus</i>	<i>intermedius</i>
									<i>Treponema</i>	<i>denticola</i>
									<i>Campylobacter</i>	<i>showae</i>
									<i>Fusobacterium</i>	<i>periodonticum</i>
									<i>Neisseria</i>	<i>mucosa</i>
									<i>Fusobacterium</i>	<i>nucleatum</i> sp. <i>nucleatum</i>
									<i>Capnocytophaga</i>	<i>gingivalis</i>
									<i>Streptococcus</i>	<i>gordonii</i>
									<i>Selenomonas</i>	<i>noxia</i>
									<i>Prevotella</i>	<i>melaninogenica</i>
									<i>Capnocytophaga</i>	<i>sputigena</i>
									<i>Leptotrichia</i>	<i>buccalis</i>
									<i>Campylobacter</i>	<i>gracilis</i>
									<i>Prevotella</i>	<i>intermedia</i>

P2 D= segundo pré-molar direito; **P2 E=** segundo pré-molar esquerdo; **P3 D=** terceiro pré-molar direito; **P3 E=** terceiro pré-molar esquerdo; **P4 D=** quarto pré-molar direito; **P4 E=** quarto pré-molar esquerdo.

APÊNDICE 5. Aspectos microbiológicos (identificação por *checkerboard*) e radiográficos de 21 dentes investigados (continuação).

Nº	AMOSTRA	DENTE	MÉDIA DO COMPRIMENTO (mm)	ÁREA (mm ²)	PERÍMETRO	H2/O2	FORMA	GRAM	GÊNERO	ESPÉCIE
25	C5.9	P3 E	11	0,08	1,82				<i>Streptococcus</i>	<i>constellatus</i>
									<i>Capnocytophaga</i>	<i>ochracea</i>
									<i>Streptococcus</i>	<i>intermedius</i>
									<i>Treponema</i>	<i>denticola</i>
									<i>Streptococcus</i>	<i>gordonii</i>
									<i>Leptotrichia</i>	<i>buccalis</i>
									<i>Campylobacter</i>	<i>gracilis</i>

P2 D= segundo pré-molar direito; **P2 E=** segundo pré-molar esquerdo; **P3 D=** terceiro pré-molar direito; **P3 E=** terceiro pré-molar esquerdo; **P4 D=** quarto pré-molar direito; **P4 E=** quarto pré-molar esquerdo.

APÊNDICE 6. Aspectos microbiológicos (identificação por *checkerboard*) e radiográficos após preparo químico-mecânico de 21 dentes investigados.

N°	AMOSTRA	DENTE	MÉDIA DO COMPRIMENTO (mm)	ÁREA (mm ²)	PERÍMETRO	H ₂ /O ₂	FORMA	GRAM	GÊNERO	ESPÉCIE
3	C2.2 -	P2 D	10*	0,06	1,79	ANF	coco	-	<i>Neisseria</i>	<i>mucosa</i>
4	C2.4 -	P3 D	11	0,11	2,04	-----	-----	---	-----	-----
5	C2.6 -	P4 D	14	0,18	2,94	-----	-----	---	-----	-----
6	C2.8 -	P2 E	10*	0,16	2,23	ANE	bacilo	-	<i>Fusobacterium</i>	<i>nucleatum sp. polymorphum</i>
						ANF	coco	+	<i>Gemella</i>	<i>morbilorum</i>
						ANE	bacilo	-	<i>Capnocytophaga</i>	<i>sputigena</i>
						ANE	bacilo	-	<i>Leptotrichia</i>	<i>buccalis</i>
7	C2.10 -	P3 E	11	0,16	2,41	ANE	bacilo	+	<i>Eubacterium</i>	<i>saburreum</i>
						ANF	coco	+	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>
						ANF	coco	+	<i>Streptococcus</i>	<i>sanguis</i>
						ANE	bacilo	-	<i>Capnocytophaga</i>	<i>ochracea</i>
						ANE	bacilo	-	<i>Fusobacterium</i>	<i>nucleatum sp. polymorphum</i>
						ANF	coco	+	<i>Gemella</i>	<i>morbilorum</i>
						ANE	bacilo	-	<i>Capnocytophaga</i>	<i>sputigena</i>
						ANE	bacilo	-	<i>Leptotrichia</i>	<i>buccalis</i>

P2 D= segundo prémolar direito; **P2 E**= segundo prémolar esquerdo; **P3 D**= terceiro prémolar direito; **P3 E**= terceiro prémolar esquerdo; **P4 D**= quarto prémolar direito; **P4 E**= quarto prémolar esquerdo.

APÊNDICE 6. Aspectos microbiológicos (identificação por *checkerboard*) e radiográficos após preparo químico-mecânico de 21 dentes investigados.

Nº	AMOSTRA	DENTE	MÉDIA DO COMPRIMENTO (mm)	ÁREA (mm ²)	PERÍMETRO	H ₂ /O ₂	FORMA	GRAM	GÊNERO	ESPÉCIE
8	C2.12 -	P4 E	14	0,15	2,38	ANF	coco	+	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>
						ANF	coco	+	<i>Streptococcus</i>	<i>intermedius</i>
						ANE	bacilo	-	<i>Fusobacterium</i>	<i>nucleatum sp. polymorphum</i>
						ANF		+	<i>Gemella</i>	<i>morbillorum</i>
						ANE	bacilo	-	<i>Capnocytophaga</i>	<i>sputigena</i>
						ANE	bacilo	-	<i>Leptotrichia</i>	<i>buccalis</i>
9	C3.2 -	P2 D	9,5	0,05	1,41	ANF	coco	+	<i>Gemella</i>	<i>morbillorum</i>
10	C3.4 -	P3 D	11	0,12	2,21	-----	-----	---	-----	-----
11	C3.6 -	P4 D	13	0,19	2,61	-----	-----	---	-----	-----
14	C3.12 -	P4 E	13	0,13	2,31	-----	-----	---	-----	-----
15	C4.2 -	P2 D	10,5	0,05	1,28	-----	-----	---	-----	-----
16	C4.4 -	P3 D	11	0,12	1,79	ANF	coco	+	<i>Gemella</i>	<i>morbillorum</i>
17	C4.6 -	P4 D	13	0,21	2,43	-----	-----	---	-----	-----
18	C4.8 -	P2 E	9,5	0,04	1,11	-----	-----	---	-----	-----
19	C4.10 -	P3 E	11	0,07	1,63	ANF	coco	+	<i>Gemella</i>	<i>morbillorum</i>
20	C4.12 -	P4 E	13	0,15	2,21	-----	-----	---	-----	-----

P2 D= segundo pré-molar direito; P2 E= segundo pré-molar esquerdo; P3 D= terceiro pré-molar direito; P3 E= terceiro pré-molar esquerdo; P4 D= quarto pré-molar direito; P4 E= quarto pré-molar esquerdo.

APÊNDICE 6. Aspectos microbiológicos (identificação por *checkerboard*) e radiográficos após preparo químico-mecânico de 21 dentes investigados (continuação).

N°	AMOSTRA	DENTE	MÉDIA DO COMPRIMENTO (mm)	ÁREA (mm ²)	PERÍMETRO	H ₂ /O ₂	FORMA	GRAM	GÊNERO	ESPÉCIE
21	C5.2 -	P2 D	9,75	0,04	1,44	ANF	coco	+	<i>Gemella</i>	<i>morbilorum</i>
						ANE	bacilo	-	<i>Capnocytophaga</i>	<i>sputigena</i>
						ANE	bacilo	-	<i>Leptotrichia</i>	<i>bucalis</i>
22	C5.4 -	P3 D	10	0,17	2,57	ANF	coco	+	<i>Gemella</i>	<i>morbilorum</i>
23	C5.6 -	P4 D	13,5	0,23	2,95	-----	-----	---	-----	-----
24	C5.8 -	P2 E	10	0,02	1,03	-----	-----	---	-----	-----
25	C5.10 -	P3 E	11	0,08	1,82	ANE	bacilo	-	<i>Prevotella</i>	<i>nigrescens</i>
						ANE	bacilo	-	<i>Fusobacterium</i>	<i>nucleatum sp. polymorphum</i>
						ANE	bacilo	-	<i>Fusobacterium</i>	<i>periodonticum</i>
						ANF	coco	-	<i>Neisseria</i>	<i>mucosa</i>
						ANF	coco	+	<i>Gemella</i>	<i>morbilorum</i>
						ANE	bacilo	-	<i>Capnocytophaga</i>	<i>sputigena</i>
						ANE	bacilo	-	<i>Leptotrichia</i>	<i>buccalis</i>

P2 D= segundo pré-molar direito; **P2 E**= segundo pré-molar esquerdo; **P3 D**= terceiro pré-molar direito; **P3 E**= terceiro pré-molar esquerdo; **P4 D**= quarto pré-molar direito; **P4 E**= quarto pré-molar esquerdo.